

534,424

Rec'd PCT/JP 10 MAY 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 1 日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/055051 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 14/47, 16/18, C12N 15/12, A61K 38/45, 45/00, A61P 1/16, 35/00, G01N 33/53, 33/50, 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009164
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 18 日 (18.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-366512
2002 年 12 月 18 日 (18.12.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町4-1-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本 薫 (MIYAMOTO, Kaoru) [JP/JP]; 〒910-0337 福井県 坂井郡 丸岡町新鳴鹿2丁目111 Fukui (JP). 山田 一哉 (YAMADA, Kazuya) [JP/JP]; 〒910-0337 福井県 坂井郡 丸岡町新鳴鹿2丁目100 Fukui (JP).
- (74) 代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA, Akira et al.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋3-3-4 京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSCRIPTION CONTROL FACTOR ZHX3

(54) 発明の名称: 転写制御因子 Z H X 3

(57) Abstract: Protein that is interactive with ZHX1 has been searched for with the use of yeast 2-hybrid system in order to determine the biological role of ZHX1 found previously and functioning as a transcription repressor. As a result, novel protein of the sequence number 1 has been found upon determination of a molecular cloning of full-length cDNA coding for novel protein and a nucleotide sequence thereof. It has become apparent that this protein (ZHX3), like the ZHX1, contains two zinc finger (Znf) motifs and five homeodomains (HDs) and exhibits transcription inhibiting activity.

(57) 要約: 発明者らが既に見出していた転写リプレッサーとして機能する Z H X 1 の生物学的役割を決定するために、酵母 2-ハイブリッドシステムを用いて、Z H X 1 と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、新規なタンパク質をコードする全長 cDNA の分子クローニング及びヌクレオチド配列を決定したところ、配列番号 1 から成る新規なタンパク質が見出された。このタンパク質 (Z H X 3) は、Z H X 1 と同様に、2 つのジンクフィンガー (Z n f) モチーフ及び 5 つのホメオドメイン (H D s) を含み、転写抑制活性を有することが明らかにした。

WO 2004/055051 A1

明 細 書

転写制御因子 ZHX 3

5 技術分野

この発明は、転写抑制活性を有するタンパク質に関し、より詳細には、肝癌に特異的な遺伝子の転写制御因子 ZHX 3 に関する。

従来技術

- 10 解糖系酵素遺伝子であるピルビン酸キナーゼ (PK) M遺伝子や I I 型ヘキソキナーゼ (HK I I) 遺伝子は、正常肝では発現が抑制されているが、肝発癌により誘導される。両者に共通の転写因子は、Nuclear Factor-Y (NF-Y) であるが、正常肝細胞と肝癌細胞における NF-Y の発現には差異が認められない。従って、NF-Y と相互作用する因子が肝癌に特異的な遺伝子発現に関与し
15 ていると考えられる。

- そこで、NF-Y で特に重要である A サブユニット (NF-YA) と相互作用する蛋白質の検索を行ったところ、873 個のアミノ酸から成り、2 つのジンクフィンガー (Zn f) モチーフと 5 つのホメオドメイン (HD) を有する ZHX 1 をクローニングしてきた (Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K.
20 (1999) FEBS Lett. 460, 41-45)。ZHX 1 は、ホメオボックスタンパク質スーパーファミリーの Zn f クラスに属し、ヒト ZHX 1 の HD 1 から HD 2 領域を含む 272 ~ 564 のアミノ酸配列は、NF-YA の N 末端グルタミンーリッチ AD との相互作用に必要である (Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45)。このノザンプロット分析を行っ
25 た結果、ZHX 1 転写産物が普遍的に発現していることがわかった (Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621; Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and

Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114)。このヒト ZHX1 遺伝子は染色体 8 q 上、マーカー CHLC. GATA50B06 及び CHLC. GATA7 G07 の間に局在する (Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621)。発明者らは、この ZHX1 が転写リプレッサーとして機能し、そして核内に局在することを報告した (Yamada, K., Kawata, H., Matsuura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374)。

- 10 なお、後述する本発明者らが発見した新規な転写制御因子 (ZHX3) をコードすると思われる塩基配列を含む配列 (GenBank/XM 029734) 及びその一部 (DDBJ/ AB007855) は既にデータベースに登録されているが、前者はデータベース上で散在していた部分配列をつなげて、推定上の蛋白質として報告されたものであり、蛋白質をコードしている可能性を示唆したに過ぎない。また後者は部分的にクローニングされていた配列であるが、機能解析は行われていなかった。
- 15 即ち、これら公開された塩基配列のコードするタンパク質が転写抑制活性を有することは全く知られておらず、またこれらの開示情報から推測することも不可能であった。

20 発明が解決しようとする課題

- 発明者らは、ZHX1 の生物学的役割を決定することを目的として、ZHX1 が NF- κ B 以外のタンパク質と相互作用し、そして遺伝子転写を制御するかどうかを調べた。そのため、発明者らは、酵母 2-ハイブリッドシステムを用いて、ラット肝臓及び卵巣顆粒膜細胞の cDNA ライブラリーにおいて ZHX1 と相互作用するタンパク質の探索を行った。
- 25

課題を解決するための手段

その結果、ZHX1、転写共因子、DNA 結合タンパク質、Zyxin、アンドロゲン誘発性アルドース還元酵素のような核タンパク質、11-19 リジン-

リッチ白血病遺伝子、及びその他の未知のタンパク質がクローニングされ、新規なタンパク質が見出された。この新規タンパク質をコードする全長 cDNA の分子クローニング及びヌクレオチド配列を決定したところ、その新規なタンパク質は 956 アミノ酸残基（配列番号 1）から成り、ZHX1 と同様に、2 つのジンクフィンガー（Zn f）モチーフ及び 5 つのホメオドメイン（HD s）を含むことが明らかになった。

発明者らはこの新規なタンパク質が ZHX1 と共に ZHX ファミリーを形成することと結論し、そしてそれを ZHX3 と名付けた。ZHX ファミリーは、互いにホモダイマーやヘテロダイマーを形成することにより、遺伝子発現の調節に関与していると推察される。

ZHX3 は、ZHX1 及び ZHX3 の両方と二量体を形成するのみでなく、上記 NF- κ B の AD とも相互作用する。さらに分析したところ、この ZHX3 は核内に局在する普遍的な転写リプレッサーであり、そして二量体として機能することが明らかになった。

即ち、本発明は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチドである。

ヒトとマウスの ZHX3 のアミノ酸配列を比べると、その相同性は 85.3% であり、ヒトとラット型 ZHX3 のアミノ酸配列の相同性は 87.3% であった。ラット型 ZHX3 のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。このアミノ酸配列はヒト ZHX3 でいうところのアミノ酸配列 114 番から 642 番目までに相当する領域と考えられる。従って、ZHX3 のアミノ酸配列（配列番号 1）と 85% 以上相同のアミノ酸配列を有するタンパク質はヒトの ZHX3 と同一の転写抑制機能を有するタンパク質であると考えられる。

従って、本発明はまた、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列に少なくとも 85% 相同のアミノ酸配列、又は配列番号 1 で表されるアミ

ノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分に少なくとも85%相同のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチドと表すことができる。

後述の実施例でも明らかにされるが、配列番号1のアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列はその転写抑制機能を担う部分であるといえる。従って、上記配列番号1で表されるアミノ酸配列の機能部分は、配列番号1で表されるアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列であることが好ましい。

肝癌細胞では専ら亢進した解糖系に依存してエネルギー代謝を行っていることから、ZHX3が正常肝では肝癌特異的アイソザム遺伝子群の発現を抑制しており、癌化に伴いZHX3の発現が低下するか、又は、ZHX3蛋白質が修飾されて活性を失うものと考えられる。従って、ZHX3の存在を検出する物質や機能を調節する薬剤を開発することにより、肝癌の診断と治療へ応用することができる。

即ち、本発明は、また、上記のタンパク質又はペプチドを有効成分とする、転写抑制を目的とする薬剤である。更に、本発明は、肝癌細胞でのみ発現する遺伝子の転写を抑制する上記いずれかのタンパク質又はペプチドである。この遺伝子はII型ヘキソース又はピルビン酸キナーゼMであってもよい。また、本発明は、このタンパク質又はペプチドを有効成分とする肝癌の治療薬である。更に、本発明は、このタンパク質又はペプチドを用いて転写抑制因子の欠如に起因する疾患、特に肝癌を治療する方法である。

また、本発明は、上記いずれかのペプチド又はタンパク質を特異的に認識することができる抗体である。更に、本発明は、この抗体を有効成分とする、転写抑制活性を有する薬剤のスクリーニング剤である。

25 図面の簡単な説明

第1図は、ヒトZHX3の推測されるアミノ酸配列のヒトZHX1との比較を示す。ZHX3及びZHX1のアミノ酸配列を比較する。2つのZn fモチーフ及び5つのHDをそれぞれプラスの印及び下線で示す。アステリスクはアミノ酸同一性を示す。破線はそれぞれのタンパク質に対応するアミノ酸配列が存在しな

いときのギャップを示す。それぞれ、114～642、242～615、及び495～956のヒトZHX3のアミノ酸配列に対応する、クローンG58及びG23、並びにKIAA0395の推測されるアミノ酸配列を示す。

第2図は、ヒトZHX3 mRNAの組織分布を示す。それぞれのレーンは、
5 示された組織から単離された2 μ gのポリA⁺-RNAを含む。サイズマーカーはkbで左側に示す。レーン1、心臓；レーン2、脳；レーン3、胎盤；レーン4、肺；レーン5、肝臓；レーン6、骨格筋；レーン7、腎臓；レーン8、膵臓；レーン9、脾臓；レーン10、胸腺；レーン11、前立腺；レーン12、精巣；レーン13、卵巣；レーン14、小腸；レーン15、結腸；レーン16、白血球。
10 第3図は、酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す。ヒトZHX1及びGAL4 AD-ZHX1融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf及びHDはそれぞれ、ジンクフィンガーモチーフ及びホメオドメインを示す。+及び-のシンボルは、GAL4 DBDに融合したヒトZHX3の242～48
15 8のアミノ酸配列を発現する、pDBD-G23、及びpACT2の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 β -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

第4図は、酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す。ヒトZHX
20 X3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸-リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは、GAL4 DBDに融合したヒトZHX1の全コード領域を発現する、pDBD-ZHX1 (1-873)、及びpACT2の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 β -ガラ
25 クトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

第5図は、酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間の最小ヘテロ二量体化ドメインの同定を示す。GSTプルダウン分析を用いた、ZHX1及びZHX3間のin vitroのヘテロ二量体化。in vitroで翻訳された³⁵S-標識された、全長ヒトZHX1又はZHX3を、

結合したGSTのみ（レーン1、5、及び8）及びGSTに融合したZHX3の242～615のアミノ酸配列（レーン3）、ヒトZHX3（レーン6）又はヒトZHX1（レーン9）タンパク質の全コード配列を含むセファロースビーズとインキュベートした。上記ビーズを激しく洗浄し、そして結合したタンパク質を溶出し、そして10%SDS-PAGEにより分析した。相互作用シグナルはオートラジオグラフィーにより検出された。レーン2、4、及び7、他のレーンで示される上記反応に添加されたタンパク質の10%がのせられた。

第6図は、酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX3の最小ホモ二量体化ドメインの同定を示す。ヒトZHX3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸-リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは第3図についての説明において示すものと同じものを示す。

第7図は、酵母2-ハイブリッドシステム又はGSTプルダウン分析を用いた、ZHX3の最小ホモ二量体化ドメインの同定を示す。GSTプルダウン分析を用いた、ZHX3のin vitroのホモ二量体化。in vitroで翻訳された、³⁵S-標識された、全長ヒトZHX3を、結合したGSTのみ（レーン2）又はGSTに融合したヒトZHX3タンパク質の全コード配列（レーン3）を含むセファロースビーズとインキュベートした。続く手順は第5図についての説明において示されたものと同じである。レーン1、他のレーンで示される上記反応に添加されたタンパク質の10%がのせられた。

第8図は、酵母2-ハイブリッドシステムを用いたNF-YA及びZHX3間の相互作用ドメインのマッピングを示す。ヒトZHX3及びGAL4 AD-ZHX3融合構築物の図解表示は左側に示す。Znf、HD、及びEは、それぞれ、ジンクフィンガーモチーフ、ホメオドメイン、及びグルタミン酸-リッチ領域を示す。+及び-のシンボルは、GAL4 DBDに融合したNF-YAの活性化ドメインを発現する、pYA1-269、及びpACT2の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 β -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

第9図は、酵母2-ハイブリッドシステムを用いたNF-YA及びZHX3間の相互作用ドメインのマッピングを示す。NF-YA及びGAL4 DBDに融合したその欠失変異体の図解表示は左側に示す。Q及びS/Tは、それぞれ、グルタミン-リッチ及びセリン/スレオニン-リッチ領域を示す。SID及びDBDは、それぞれ、サブユニット相互作用及びDNA結合ドメインを示す。+及び-のシンボルは、pDBD及び、GAL4 ADに融合したヒトZHX3の242～488のアミノ酸配列を発現する、pAD-ZHX3 (242-488) の組み合わせを含む酵母と比較した、それぞれ、 β -ガラクトシダーゼ活性の増加した及び変化のない値を示す。

第10図は、ZHX3は転写リプレッサーであることを示す。HEK293細胞を2 ngのpRL-CMV、50 ngの(カラム上に示す)SV40プロモーターダイレクティッド発現ベクター、及び100 ngの5×GAL4-pGL3 Control又はpGL3-Controlレポータープラスミドで共トランスフェクトした。pSG424及びpGAL4-ZHX3 (1-956) は、それぞれ、GAL4 DBDのみ及びGAL4 DBDに融合したヒトZHX3の全コード配列を発現する。100%の値は、それぞれ、50 ngのpSG424の存在下におけるレポータープラスミドについてのプロモーター活性に示された。

第11図は、ZHX3は転写リプレッサーであることを示す。HEK293細胞を2 ngのpRL-CMV、50 ngの(カラム上に示す)SV40プロモーターダイレクティッド発現ベクター、100 ngの5×GAL4-pGL3 Controlレポータープラスミド、示された量のpCMV-ZHX1 (242-432) 発現プラスミドで共トランスフェクトした。プラスミド(202 ng)の総量は、必要であれば、pcDNA3.1His-C2の添加により調節された。100%の値は、50 ngのpSG424及び50 ngのpcDNA3.1His-C2の存在下におけるレポータープラスミドのプロモーター活性に示された。トランスフェクション48時間後、上記細胞を回収し、そしてホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を決定した。ホタルルシフェラーゼ活性は全ての実験においてウミシイタケルシフェラーゼ活性により正規化された。それぞれのカラム及び棒は少なくとも5のトランスフェクション実験の平均及び標準偏差

を示す。

第12図は、ZHX3の最小リプレッサードメインの決定を示す。pSG424及びさまざまなpGAL4-ZHX3構築物は、それぞれ、GAL4 DBDのみ及びGAL4 DBDに融合したヒトZHX3のさまざまな欠失変異体を発
5 現する。条件は第10図についての説明において示されたものと同じである。それぞれのカラム及び棒は少なくとも5のトランスフェクション実験の平均及び標準偏差を示す。

第13図は、HEK293細胞におけるZHX3の細胞内局在及び核移行シグナルの決定を示す。GFPのみ又はGFPのC末端に融合されたさまざまな切断
10 されたZHX3タンパク質をコードする、発現プラスミド(300ng)をHEK293細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後、GFP融合タンパク質の細胞内局在を観察した。構築物はそれぞれのパネルの上部に示す。

第14図は、ZHX3の機能ドメインを示す。Znf、ジンクフィンガーモチーフ；HD、ホメオドメイン；E、グルタミン酸リッチ領域；DD、二量体化
15 ドメイン；ID、NF-YAとの相互作用ドメイン；RD、リプレッサードメイン；NLS、核移行シグナル。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意
20 図したものではない。

実施例

本実施例において、酵母2-ハイブリッドシステム、pDsRed1-C1、X- α -gal、ヒト精巢マラソン-レディ cDNA、Advantage2PCR キット、ヒト Multiple Tissue Northern Blot 及び BlotII、ExpressHyb ハイブリダイゼーション
25 溶液、及び pEGFP-C1 は Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。pGEX-4T-2、pGEX-5X-1、 α -³²PdCTP (111TBq/mmol)、グルタチオン-セファロース 4 B、及び ³⁵S-メチオニン (37TBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech (Cleveland, OH) から購入した。HEK293 細胞、ヒト胎児腎細胞系は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。

- TRIOZOL 試薬、SuperscriptII、pcDNA3.1His-C プラスミド、及び LIPOFECTAMINE PLUS は Invitrogen (Groningen, Netherlands) から購入した。ExTaqDNA ポリメラーゼ、pT7Blue-T2 ベクター、及び BcaBestDNA ラベリングキットは TaKaRa BIOMEDICALS から入手した。pGEM-T Easy ベクター、
- 5 T7 TNT Quick-結合転写／翻訳系、pGL3-Control、pRL-CMV、及び二重ルシフェラーゼ分析系は Promega (Madison, WI) から購入した。Big Dye terminator FS cycle シークエンシングキットは Applied Biosystems Japan (Tokyo, Japan) から購入した。TOPP3 細胞は Stragene (La Jolla, CA) から入手した。QIAGEN プラスミドキットは QIAGEN (Hilden, Germany) から購入した。
- 10 本実施例において行った試験の手順を以下に示す。

試験例 1 プラスミドの構築

- pACT2B1 プラスミドを既報に従って作製した (Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45)。
- 15 クローン化された G23 プラスミド、pAD-G23 を EcoRI/XhoI 又は SfiI/BglII で消化し、それぞれの断片を pGEX-4T-2 ベクターの EcoRI/XhoI サイト又は pGBKT7 ベクターの SfiI/BamHI サイト中へサブクローニングし、それぞれ pGST-G23 及び pDBD-G23 を得た。
- 20 pAD-G23 の 250bp の EcoRI/HindIII 断片を pDsRed1-C1 の EcoRI/HindIII サイト中へサブクローニングし、pDsRed-逆向き G23 (HD1) を作製した。上記 S-DsRed1C1-HindIII (配列番号 3) 及び上記 A-S-DsRed1C1-SalI オリゴヌクレオチド (配列番号 4) をその後、アニーリングし、リン酸化し、そして pDsRed1-C1 の HindIII/SalI サイト中へ挿入し、pDsRed1-C1E1 を得た。pDsRed-逆向き G23 (HD1) の EcoRI/BglII 断片を pDsRed1-C1E1 の EcoRI/BamHI 中へサブクローニングし、pDsRed-rZHX3 (HD1) を作製した。生ずるプラスミドの EcoRI/XhoI 断片を pACT2 の EcoRI/XhoI サイト中へサブク
- 25

ローニングし、pAD-ZHX3 (242-488) を得た。

pBSII-KIAA0395は Dr.Takahiro Nagase (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE, Japan) から賦与された。上記プラスミドの1.2 kbのSalI/ApaI断片をpDsRed1-C1E1のSalI/ApaIサイト中へサブクローニングし、pDsRed-ZHX3 (HD2-5) を作製した。生ずるもののBglII/BamHI断片をpACT2B1のBamHIサイト中へサブクローニングし、pAD-ZHX3 (498-903) を得た。

pAD-ZHX1 (142-873)、pAD-ZHX1 (272-873)、pAD-ZHX1 (565-873)、pAD-ZHX1 (272-564)、pAD-ZHX1 (272-432)、pAD-ZHX1 (430-564)、pAD-ZHX1 (345-463)、pDBD、pYA1-269、pYA1-140、pYA1-112、pYA141-269、pYA172-269、及びpYA205-269を既報に従って作製した (Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45; Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621)

HEK293細胞からのトータルRNAを製造業者のプロトコルに従ってTRIzol試薬を用いて調製した。逆転写-ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) を若干の改変を伴って以前に示したように行った (Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621)。ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) 条件はExTaq DNAポリメラーゼの使用を除いては、以前に示した (Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621)。S-hZHX3-ApaI2 (配列番号5) 及びAs-hZHX3-STOP4 (配列番号6)、S-hZHX3-NcoI (配列番号7) 及びAs-hZHX3-BsmBI2 (配列番号8)、S-hZHX3-Met (配列番号9) 及びAs-hZHX3-NcoI (配列番号10)、S-hZHX3-HD1 (配列番号11) 及びAs-hZHX3-HD2 (配列番号12)、S-hZHX3-HD1 (配列番号11) 及びAs-hZHX3-1506 (配

列番号13)、S-h ZHX3-1090 (配列番号14) 及びAs-h ZHX3-HD2 (配列番号12)、S-h ZHX3-HD2 (配列番号15) 及びAs-h ZHX3-HD2 (配列番号12)、S-h ZHX3-HD1 (配列番号11) 及びAs-h ZHX3-HD1 (配列番号16)、及びS-h ZHX3N (配列番号17) 及びAs-h ZHX3N (配列番号18) の組み合わせをプライマーとして用いた。

これらの生成物をpGEM-T Easyベクター中へサブクローニングし、それぞれ、pGEM-T Easy ZHX3 (ApaI/STOP)、pGEM-T Easy ZHX3 (NcoI/BsmBI)、pGEM-T Easy ZHX3 (Met/NcoI)、pGEM-T Easy ZHX3 (HD1-2)、pGEM-T Easy ZHX3 (HD1-1506)、pGEM-T Easy ZHX3 (1090-HD2)、pGEM-T Easy ZHX3 (HD2)、pGEM-T Easy ZHX3 (HD1)、及びpGEM-T Easy ZHX3Nを得た。

GBKT7MCS1 (配列番号19) 及びGBKT7MCS2オリゴヌクレオチド (配列番号20) をアニーリングし、リン酸化し、そしてpGBKT7のEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGBKT7B1を得た。上記pGEM-T Easy ZHX3 (ApaI/STOP) のApaI/BamHI断片をpDsRed-ZHX3 (HD2-5) のApaI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pDsRed-ZHX3 (HD2-STOP) を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (NcoI/BsmBI) のEcoRI/BsmBI断片をpDsRed-ZHX3 (HD2-STOP) のEcoRI/BsmBIサイト中へサブクローニングし、pDsRed-ZHX3 (NcoI-STOP) を得た。

S-GBKT7-NdeI (配列番号21) 及びAs-GBKT7-NcoIオリゴヌクレオチド (配列番号22) をアニーリングし、リン酸化し、そしてpGBKT7B1のNdeI/NcoIサイト中へ挿入し、pGBKT7NENを得た。pDsRed-ZHX3 (NcoI-STOP) の2kbのNcoI/BamHI断片をpGBKT7NENのNcoI/BamHIサイト中へサブクロー

ーニングし、pGBKT7-ZHX3 (NcoI-STOP) を得た。上記pGEM-T Easy ZHX3 (Met/NcoI) をNcoIで消化し、960bpの断片をpGBKT7-ZHX3 (NcoI-STOP) のNcoIサイト中へサブクローニングし、pDBD-ZHX3 (1-956) を得た。生ずる

5 プラスミドをBamHIで消化し、Klenow反応により平滑末端処理し、そしてその後EcoRIで消化した。上記2.9kbの断片をpGEX-5X-1ベクターのEcoRI/SmaIサイト中へサブクローニングし、pGST-ZHX3 (1-956) を得た。pGST-ZHX3 (1-956) のEcoRI/XhoI断片をpACT2B1のEcoRI/XhoIサイト中へサブクロー

10 ニングし、pAD-ZHX3 (1-956) を得た。PCRはS-hZHX3HD1 (配列番号11) 及びAs-hZHX3-HD1-Eco (配列番号23) の組み合わせをプライマーとして、pDBD-ZHX3 (1-956) を鋳型として用いて行われた。EcoRIでの消化後、上記断片をpACT2B1のEcoRIサイト中へサブクローニングし、pAD-ZHX3 (303-364) を

15 得た。

pSG424、pSG424B1、5×GAL4-pGL3 Control、及びpEGFP-C1E1プラスミドは以前に示された(6、13~15)。pDBD-ZHX3 (1-956) の2.9kbのEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサ

20 イット中へサブクローニングし、それぞれ、pGAL4-ZHX3 (1-956) 及びpGFP-ZHX3 (1-956) を得た。pDsRed-ZHX3 (HD2-5) のBglII/BamHI断片をpSG424B1のBamHIサイト中へサブクローニングし、pGAL4-ZHX3 (498-903) を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (HD1-2)、pGEM-T Easy ZHX

25 3 (HD1-1506)、pGEM-T Easy ZHX3 (1090-HD2)、及びpGEM-T Easy ZHX3 (HD2) のEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、それぞれ、pGAL4-ZHX3 (303-555)、pGAL4-ZHX3 (303-502)、pGFP-ZHX3 (3

03-555)、pGFP-ZHX3 (303-502)、pGFP-ZHX3 (364-555)、pGFP-ZHX3 (497-555)を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (HD1) のEcoRI/BamHI断片をpSG424B1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGAL4-ZHX3 (303-364)を得た。

PCRはS-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-909 (配列番号25)、S-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-435 (配列番号26)、S-hZHX3-436 (配列番号27) 及びAs-hZHX3-909 (配列番号25)、S-hZHX3-Met3 (配列番号24) 及びAs-hZHX3-321 (配列番号28)、S-hZHX3-322 (配列番号29) 及びAs-hZHX3-435 (配列番号26)、及びS-hZHX3-1663 (配列番号30) 及びAs-hZHX3-BsmBI-2 (配列番号31) の組み合わせをプライマーとして、pDBD-ZHX3 (1-956) を鋳型として用いて、そしてS-hZHX3-1090 (配列番号14) 及びAs-hZHX3-1506 (配列番号13) の組み合わせをプライマーとして、pGFP-ZHX3 (303-555) を鋳型として用いて行われた。増幅されたDNAもpGEM-T Easy又はpT7Blue-2 T-ベクター中へサブクローニングし、pGEM-T Easy ZHX3 (Met/909)、pGEM-T Easy ZHX3 (Met/435)、pGEM-T Easy ZHX3 (436/909)、pT7Blue-2 T ZHX3 (Met/321)、pT7Blue-2 T ZHX3 (322/435)、pGEM-T Easy ZHX3 (1663/2022)、及びpGEM-T Easy ZHX3 (1090/1506) をそれぞれ得た。これらのプラスミドのEcoRI/BamHI断片をpSG424B1又はpEGFP-C1E1ベクターのEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGAL4-ZHX3 (1-145)、pGAL4-ZHX3 (146-303)、pGFP-ZHX3 (1-303)、pGFP-ZHX3 (1-107)、pGFP-ZHX3 (108-145)、及びpGFP-ZHX3 (146-303) をそれぞれ得た。pGEM-T Easy ZHX3 (1090/1506) のEcoRI/BamH

I断片をpSG424B1のEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGAL4-ZHX3 (364-502)を得た。pGEM-T Easy ZHX3 (1663/2022)のEcoRI/BsmBI断片をpDsRed-ZHX3 (HD2-STOP)のEcoRI/BsmBIサイト中へサブクローニングし、pDsRed-ZHX3 (1663-STOP)を得た。生ずるプラスミドのEcoRI/BamHI断片をpEGFP-C1E1のEcoRI/BamHIサイト中へサブクローニングし、pGFP-ZHX3 (555-956)を得た。

HisCMCS1 (配列番号32) 及びHisCMCS2オリゴヌクレオチド (配列番号33) をアニーリングし、リン酸化し、そしてpcDNA3.1His-CのKpnI/EcoRIサイト中へサブクローニングし、pcDNA3.1His-C2を得た。上記pGST-ZHX1 (272-432) は以前に示された(12)。pGST-ZHX1 (272-432) の480bpのBamHI断片をpcDNA3.1His-C2のBamHIサイト中へサブクローニングし、pCMV-ZHX1 (272-432) を得た。

以上全てのプラスミドのヌクレオチド配列をDNAシーケンサー3100 (Applied Biosystems)を用いて確認した。

試験例2 ライブラリースクリーニング

酵母転写因子GAL4のDNA結合ドメイン(DBD)に融合した、ヒトZHX1の全コード配列を発現する、pDBD-ZHX1 (1-873) (pGBKT7-ZHX1 (1-873))、及びラット顆粒膜細胞及び肝cDNAライブラリーの構築は既報に従って行った (Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114 等)。AH109酵母細胞を上記pDBD-ZHX1 (1-873) プラスミドで形質転換した。上記株はcDNAライブラリーをスクリーニングするためのおとりとして使用された。TE/LiAc-に基づいた高効率形質転換法がライブラリースクリーニングに使用された (Yamada, K., Wang,

J.-C., Osawa, H., Scott, D. K., and Granner, D. K. (1998) BioTechniques 24, 596-600)。肝及び顆粒膜細胞 cDNA ライブラリーの 1500 万及び 1100 万の独立のクローンがそれぞれ、4 mM 3-アミノトリ
アゾール及び X- α -gal で補充された、ヒスチジナー、トリプトファン、
5 ロイシナー、及びアデニナーなしの合成デキストロスプレート上にプレートさ
れた。33 及び 109 の陽性クローンがそれぞれ第一形質転換体から得られた。
量化可能な lacZ レポーターを含む、上記酵母株 SFY526、及び pGBKT7
又は pDBD-ZHX1 (1-873) プラスミドのいずれかを、第一スク
リーニング又は親ベクター、pACT2 における陽性クローンから単離されたプ
10 ラスミドで形質転換した。第二スクリーニングでは、肝及び顆粒膜細胞 cDNA
ライブラリーの、それぞれ、16 及び 25 のクローンが再現可能な高 β -ガラク
トシダーゼ活性を特に示した。o-ニトロフェニル β -D-ガラクトシドを用
いる、計量可能な β -ガラクトシダーゼ分析を、既報に示されたように (Yamada,
K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45;
15 Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621 等)、浸透された細胞に
ついて行った。それぞれの陽性クローンからのヌクレオチド配列を BLAST 配
列探索及び比較プログラムを用いて GenBank データベース内に入っている
ものと比較した。

20

試験例 3 cDNA 末端の高速増幅 (RACE)

ヒト ZHX3 cDNA の 5' 末端を得るために、ヒト精巢マラソン-レディ c
DNA 及び Advantage 2 PCR キットを用いて 5' -RACE 法を使用
した。2 つの遺伝子特異的プライマー、hZHX3-5RACE-As1 (配列
25 番号 34)、及び hZHX3-5RACE-As2 (配列番号 35) を使用した。
上記 5' -RACE 手順は製造業者が推奨するプロトコルに従って行われた。増
幅された DNA 断片を pGEM-T Easy ベクター中にサブクローニングし、
そしてそれらのヌクレオチド配列を決定した。

試験例4 Poly (A) +RNAプロット分析

ヒトMultiple Tissue Northern Blot及びBlot IIを、pGEM-T Easy hZHX3Nプラスミドから単離された、ヒトZHX3 cDNAの0.6 kbの α - ^{32}P dCTP-標識EcoRI断片とハイブリダイゼーションし、そしてBcaBest DNA標識キットで標識した。ExpressHybハイブリダイゼーション溶液を前ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションに使用した。前ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション及び洗浄の手順は供給者により提供されるプロトコルに従って行われた。

10

試験例5 酵母2-ハイブリッドシステム及び液体 β -ガラクトシダーゼ分析

ZHX3とのZHX1のヘテロ二量体化ドメインを分析するために、pDBD又はpDBD-G23を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADを融合したZHX1のさまざまな切り取られた形態、又はpACT2で形質転換した。ZHX1とのZHX3のヘテロ二量体化ドメイン又はZHXのホモ二量体化ドメインをマッピングするために、pDBD、pDBD-ZHX1 (1-873) 又はpDBD-G23を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADを融合したZHX3のさまざまな切り取られた形態、又はpACT2で形質転換した。ZHX3のNF-YAとの相互作用ドメインを調べるために、pDBD又はpYA1-269を含むSFY526酵母株を、GAL4 ADに融合されたZHX3のさまざまな切り取られた形態で形質転換した。NF-YAのZHX3との相互作用ドメインをマッピングするために、pAD-ZHX3 (242-488) を含むSFY526酵母株を、GAL4 DBDに融合されたNF-YAのさまざまな切り取られた形態で形質転換した。

これらの β -ガラクトシダーゼ活性は既報 (Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45; Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621; Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T.,

Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114) に示されたように、決定された。

試験例 6 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) プルダウン分析

5 p GST-ZHX1 (1-873) プラスミドを既報に従って作製した (Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114)。TOPP3細胞を p GEX-5X-1、p GST-ZHX1 (1-873)、p GST-G23又は
10 p GST-ZHX3 (1-956) 融合タンパク質発現プラスミドで形質転換した。上記GST融合タンパク質の調製、in vitro で翻訳されたZHX1の³⁵S-
一標識及びプルダウン分析は以前に示された (Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 614-621; Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114)。上記pDBD-ZHX3 (1-956) プラスミドを
15 in vitro で翻訳された、³⁵S-一標識された、ZHX3の調製のために使用した。最後に、ビーズを等体積の2×SDSサンプル緩衝液に再懸濁し、そしてそれぞれの
20 上清を前染色分子量マーカーと共に、10% SDS-PAGEゲルにのせた。上記ゲルを乾燥させ、そしてFUJIX画像化プレート (Kanagawa, Japan) に露出した。相互作用シグナルをFUJIX BAS-2000画像分析システムを用いて検出した。それぞれの融合タンパク質の比較の純度及び量はクマシーブリ
リアントブルーR-250でのゲル染色により決定された。

25

試験例 7 細胞培養及びDNAトランスフェクション

HEK293細胞を10%ウシ胎児血清で補充したDulbecco's modified Eagles medium中で37℃で5%CO₂インキュベーター中で培養した。

DNAトランスフェクションはLIPOFECTAMINE PLUS試薬を

用いて行われた。トランスフェクションに使用された全てのプラスミドはQ I A
G E Nプラスミドキットを用いて調製され、続いてC s C l 勾配超遠心分離を行
った。細胞（ウェル当たり 5×10^4 ）をトランスフェクションの前日に24ウ
ェルプレート中で接種した。上記5×GAL4-pGL3 C o n t r o lは既
5 報に従って作製した（Tanaka, T., Inazu, T., Yamada, K., Myint, Z.,
Keng, V. W., Inoue, Y., Taniguchi, N., and Noguchi, T. (1999)
Biochem. J. 339, 111-117）。5×GAL4-pGL3 C o n t r o l又は
pGL3-C o n t r o lはレポータープラスミドとして使用された。ZHX3
の転写活性の決定のために、100 ngのレポータープラスミド、2 ngのpR
10 L-CMW、及び示された量のGAL4 DBD-ZHX3融合タンパク質発現
プラスミドをトランスフェクトした。プラスミドの総量（152 ng）を、必要
であれば、pSG424の添加により調節した。ZHX3のZHX1とのヘテロ
二量体化の、ZHX3の転写活性への効果の分析のために、100 ngのレポー
タープラスミド、2 ngのpRL-CMW、50 ngのGAL4 DBD融合タ
15 ンパク質発現プラスミド、及び示された量のヒトZHX1の二量体化ドメインの
発現プラスミド、pCMV-ZHX1（272-432）をトランスフェクトし
た。プラスミドの総量（202 ng）を、必要であれば、pcDNA3.1Hi
s-C2の添加により調節した。緑色蛍光タンパク質（GFP）-融合タンパク
質の観察のために、300 ngの示されたGFPプラスミドをトランスフェクト
20 した。トランスフェクション3時間後、培地を変えた。48時間後、上記細胞を
ルシフェラーゼ分析にかけ又はLaser microscope (Olympus)で観察した（1
5）。ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ分析を製造業者の推奨するプロトコ
ル（Promega）に従って行った。ルシフェラーゼ活性をBerthold Lumat model
LB 9501 (Wildbad, Germany)により決定した。ホタルルシフェラーゼ活性（比
25 較光単位）をウミシイタケルシフェラーゼ活性により正規化した。

実施例 1

本実施例では、ZHX1による転写抑制の分子メカニズムを分析し、ヒトZHX
X1が既知の又は新規の転写因子と相互作用するかという問題を調べるために、

ZHX 1相互作用タンパク質のスクリーニングを行った。ヒトZHX 1の全コード配列をGAL 4 DBDに融合し、そしてこのキメラタンパク質を酵母2-ハイブリッドシステム（試験例5）を用いてラット肝及び顆粒膜細胞cDNAライブラリーをスクリーニングするためのおとりとして使用した（試験例2）。それぞれ
5 のライブラリーの約 1.5×10^7 及び 1.1×10^7 の独立のクローンをスクリーニングし、そして16及び25クローンが再現可能なHis⁺、Ade⁺、及びα-gal陽性特性をそれぞれ示した。これらのクローンからGAL 4 AD融合タンパク質をコードするプラスミドを単離した。それらのヌクレオチド配列の決定後、それらをBLAST探索プログラムを用いてGenBankデータベースと比較した。その結果を表1に示す。
10

表 1

The ZHX1-interacting proteins

Protein	Number of clone
BS69 corepressor	9
Nuclear protein, ataxia-telangiectasia-like protein	5
Androgen-induced aldose reductase	3
ATF-IP	2
Spinocerebellar ataxia type I	2
Zyxin	2
Elf-1	1
Eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene	1
ZHX1	8
unknown	8

表 1 に示すように、BS69 共リプレッサー、核タンパク質、毛細血管拡張性運動失調様タンパク質、アンドロゲンで誘発されるアルドース還元酵素、活性化転写因子 (ATF) 相互作用タンパク質 (ATF-IP)、脊髄小脳性運動失調 I 型、ジキシン、Elf-1、11-19 リジン-リッチ白血病遺伝子、及び ZHX1 が既知のタンパク質としてクローニングされた (Hirano, S., Yamada, K., Kawata, H., Shou, Z., Mizutani, T., Yazawa, T., Kajitani, T., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Shigematsu, Y., Mayumi, M., and Miyamoto, K. (2002) Gene 290, 107-114 等)。8 クローンは未知のタンパク質をコードした。興味深いことに、3 クローン、G23、G58、及び L26 は Zn f 及び HD モチーフの両方をコードした。詳細なヌクレオチド配列分析は、G23 のヌクレオチド配列が G58 のそれに含まれており、そして上記ヌクレオチド配列ははじめにクローニングされたヒト KIAA0395 cDNA のそれと相似性を示したことを示した。発明者らはこの研究においてこれらのクローンの分析に焦点をおいた。KIAA0395 とは異なる上記 L26 クローンは ZHX2 として他の報告において現れるであろう。

次に、ヒトK I A A 0 3 9 5 cDNAの5' -非コード配列及び残りのコード領域を単離するために、5' -RACE法（試験例3）を用いた。遺伝子特異的プライマー及びアダプタープライマーの組み合わせを用いて、cDNA断片をヒト精巣マラソンcDNAを鋳型としてPCRにより得た。最後に、全長cDNAの大きさが9, 302bpであることが決定された。

非常に興味深いことに、全長cDNAは965アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有し、そしてそのタンパク質の推定されたアミノ酸配列はZHX1に加えて2つのCys₂-His₂-型Zn fモチーフ及び5つのHDを含む。このアミノ酸配列を配列番号1に示す。発明者らはこのタンパク質をZHX3と呼ぶ。記号ZHX3は、ジンクフィンガー及びホメオボックス3の名前から、HUGO Nomenclature Committeeに提示された。第1図にこのヒトZHX3の推測されるアミノ酸配列のヒトZHX1との比較を示す。

このヒトZHX3タンパク質は予測された分子量104.7キロダルトン及び等電点5.68を有する。上記pAD-G58及びpAD-G23がそれぞれZHX3の114～642の及び242～615のアミノ酸配列をコードする一方で、上記K I A A 0 3 9 5はヒトZHX3の498～956のアミノ酸配列をコードする。転写制御ドメインとして働きうるグルタミン酸リッチ領域は670～710のアミノ酸配列中に存在し、そして推定される核移行シグナルは存在しない。ZHX3及びZHX1の間のコード領域におけるヌクレオチド配列及びアミノ酸配列における相同性は、それぞれ46.9%及び34.4%であった。

次に、ヒトZHX3 mRNAの組織分布をノザンプロット分析（試験例4）により決定した。第2図に示すように、ヒトZHX3 mRNAは複数のバンド、長さ9.4、7.3、5.0、及び4.6kbとして検出された。発明者らのクローニングされた挿入物の大きさは9,302bpであったので、それは最長の転写物とほぼ同じである。強さは組織間でさまざまであったが、これらの転写物は調べた全ての組織において観察された。このことはヒトZHX3 mRNAは普遍的に発現されることを示している。

実施例 2

- 本実施例では、ZHX1のどのドメインがZHX3との相互作用に必要とされるかという問題を調べるために、ZHX1及びZHX3の間の最小ヘテロ二量体化ドメインのマッピングを行った。酵母株SFY526を、GAL4 DBDのみを発現するpDBD又はGAL4 DBDに融合されたZHX3のアミノ酸残基242～615をコードするpDBD-G23で形質転換した。上記2つの酵母株はレポーター酵母として使用された。GAL4 ADのみを発現するpACT2又はGAL4 ADに融合されたZHX1のさまざまな切断された形態をコードするいくつかのプラスミドは獲物プラスミドとして使用された。pDBDを含むレポーター酵母をこれらの獲物プラスミドで形質転換したとき、それらは低 β -ガラクトシダーゼ活性を示した（データは示していない）。さらに、pDBD-G23を含むレポーター酵母をpACT2、pAD-ZHX1（565-873）、pAD-ZHX1（430-564）又はpAD-ZHX1（345-463）で形質転換したとき、これらの酵母も低 β -ガラクトシダーゼ活性を示した（第3図）。対照的に、上記酵母をpAD-ZHX1（142-873）、pAD-ZHX1（272-873）、pAD-ZHX1（272-564）又はpAD-ZHX1（272-432）で形質転換したとき、高 β -ガラクトシダーゼ活性が観察された。上記pAD-ZHX1（272-432）はZHX1の242～432のアミノ酸残基をコードする。
- 次に、ZHX3のどのドメインがZHX1との相互作用に必要とされるかの問題を決定した。酵母株SFY526を、GAL4 DBDに融合されたZHX1の全コード配列をコードするpDBD-ZHX1（1-873）又はpDBDで形質転換した。上記2つの酵母株はレポーター酵母として使用された。上記pACT2又はGAL4 ADに融合されたZHX3のさまざまな切断された形態をコードするいくつかのプラスミドは獲物プラスミドとして使用された（第4図）。pDBDを含むレポーター酵母をこれらの獲物プラスミドで形質転換したとき、それらは低 β -ガラクトシダーゼ活性を示した（データは示していない）。これらの酵母はpDBD-ZHX1（1-873）を含むレポーター酵母をpAD-G23又はpAD-ZHX3（242-488）で形質転換したときのみ、高 β -

ガラクトシダーゼ活性を示した。上記 pAD-ZHX3 (242-488) は ZHX3 の 242~488 のアミノ酸残基をコードする。

これらの結果は ZHX1 及び ZHX3 は HD1 を含むそれぞれの領域を通してヘテロ二量体化することを示す。

- 5 次に、ZHX1 及び ZHX3 の間の特異的相互作用を実証するために *in vitro* GST プルダウン分析 (試験例 6) を行った。発明者らは 4 つのプラスミド、GST のみを発現する pGEX-5X-1、GST に融合されたヒト ZHX3 の 242~615 のアミノ酸配列をコードする pGST-G23、GST に融合されたヒト ZHX3 タンパク質の全コード領域を発現する pGST-ZHX3 (1-
- 10 956)、及び GST に融合されたヒト ZHX1 タンパク質の全コード領域を発現する pGST-ZHX1 (1-873) をそれぞれ使用した。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、そしてグルタチオンセファロースビーズに固定した。上記 *in vitro* で翻訳した、³⁵S-標識した、全長ヒト ZHX1 は、GST-G23 及び GST-ZHX3 (1-956) に結合するが、GST のみには結合し
- 15 ないことがわかった (第 5 図、レーン 3 及び 6)。さらに、上記 *in vitro* で翻訳した、³⁵S-標識した、全長ヒト ZHX3 は GST-ZHX1 (1-873) に結合するが、GST のみには結合しないことがわかった (第 5 図、レーン 9)。対照的に、プログラム化されていない網状赤血球溶解物は上記タンパク質のいずれにも結合しなかった (データは示していない)。
- 20 これらの結果は、ZHX1 は *in vivo* 及び *in vitro* の両方で、ZHX3 とヘテロ二量体を形成することができることを示す。

実施例 3

- 本実施例では、ZHX1 はホモ二量体を形成するので、酵母 2-ハイブリッド
- 25 システム (試験例 5) を用いて ZHX3 のホモ二量体の形成を調べるために、ZHX3 の最小ホモ二量体化ドメインのマッピングを行った。pDBD 又は pDBD-G23 を含む 2 つの SFY526 酵母株をレポーター酵母として使用した。発明者らはさまざまな獲物プラスミド、pACT2、pAD-G23、及び pAD-ZHX3 (242-488)、pAD-ZHX3 (303-364)、及び p

AD-ZHX3 (498-903) をそれぞれ調製した。これらのプラスミドをレポーター酵母に形質転換し、そして β -ガラクトシダーゼ活性をそれぞれの場合において決定した(第6図)。pDBDを含むレポーター酵母を上記プラスミドで形質転換したとき、それらは低 β -ガラクトシダーゼ活性を示した(データは示していない)。さらに、pDBD-G23を含むレポーター酵母をpACT2、pAD-ZHX3 (303-364)、及びpAD-ZHX3 (498-903)で形質転換したときも、非常に低い β -ガラクトシダーゼ活性が検出された。対照的に、pAD-G23又はpAD-ZHX3 (242-488)で形質転換した酵母は高 β -ガラクトシダーゼ活性を示した。これらの結果は、ZHX3は242~488の領域を介してホモ二量体を形成することができることを示す。

次に、ZHX3のホモ二量体化を実証するために *in vitro* GSTプルダウン分析を行った。発明者らは2つのプラスミド、pGEX-5X-1及びpGST-ZHX3 (1-956) をそれぞれ使用した。これらのタンパク質を大腸菌で発現させ、そしてグルタチオンセファロースビーズに固定した。上記 *in vitro* で翻訳された、 35 S-標識された、全長ヒトZHX3はGST-ZHX3 (1-956)に結合するがGSTのみには結合しないことがわかった(第7図)。対照的に、プログラム化されていない網状赤血球溶解物は上記タンパク質のいずれにも結合しなかった(データは示していない)。これらの結果は、ZHX3は *in vivo* 及び *in vitro* でホモ二量体を形成することができることを示す。

実施例4

本実施例では、ZHX3がNF-YAのADとも相互作用することを調べた。

ヒトZHX1ははじめにNF-YAと相互作用するタンパク質としてクローニングされた(Yamada, K., Printz, R. L., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 614-621)。本実施例では、ZHX3のNF-YAとの相互作用を酵母2-ハイブリッドシステム(試験例5)を用いて調べた。発明者らはそれぞれpDBD又はpYA1-269で形質転換した2つのレポーター酵母株を使用した。上記pYA1-269はGAL4 DBDと融合したNF-YAのADを発現する。上記pACT2、pAD

—G 2 3、p AD—ZHX 3 (4 9 8—9 0 3)、p AD—ZHX 3 (2 4 2—4 8 8)、p AD—ZHX 3 (3 0 3—3 6 4)、及びp AD—ZHX 3 (1—9 5 6) をレポーター酵母株に形質転換し、そしてそれらの β -ガラクトシダーゼ活性を決定した。p DBDを含むレポーター酵母をこれらのプラスミドで形質転換したとき、それらの β -ガラクトシダーゼ活性はかなり低いことがわかった (データは示していない)。第8図中に示すように、p YA 1—2 6 9を含むレポーター酵母をp ACT 2、p AD—ZHX 3 (4 9 8—9 0 3) 又はp AD—ZHX 3 (3 0 3—3 6 4) で形質転換したときも、それらの β -ガラクトシダーゼ活性低かった。しかしながら、上記酵母をp AD—G 2 3、p AD—ZHX 3 (1—9 5 6) 又はp AD—ZHX 3 (2 4 2—4 8 8) で形質転換したとき、高い値の β -ガラクトシダーゼ活性が検出された。これらの結果は、ZHX 3はNF—YAのADと相互作用し、そして残基2 4 2～4 8 8のアミノ酸配列がこの相互作用に重要であることを示す。

次に、酵母2-ハイブリッドシステム (試験例5) を用いてNF—YAのZHX 3との最小相互作用ドメインを同定した。第9図に示すように、NF—YAのADはそれぞれグルタミン—リッチ及びセリン/スレオニン—リッチドメインから成る。p AD—ZHX 3 (2 4 2—4 8 8) を含むSFY 5 2 6酵母株がレポーター酵母として使用された。GAL 4 DBDに融合されたNF—YAの切断された形態を発現する、さまざまなプラスミドを上記酵母に形質転換し、そしてそれらの β -ガラクトシダーゼ活性を決定した。その結果、どちらもNF—YAの1 4 1～2 6 9のアミノ酸配列を含む、p YA 1—2 6 9又はp YA 1 4 1—2 6 9を含む酵母のみが高い値の β -ガラクトシダーゼ活性を示した。これらの結果は、NF—YAのセリン/スレオニン—リッチADはZHX 3との最小相互作用ドメインを表すことを示す。

25

実施例 5

本実施例では、ZHX 3が転写リプレッサーであることを確認するために、哺乳類のワンハイブリッドシステム (試験例7) を用いてZHX 3の転写の役割を決定した。GAL 4—結合部位の5つのコピーがp GL 3—ControlのS

V40プロモーターの上流に挿入された、上記5×GAL4-pGL3Controlプラスミドを、レポータープラスミドとして使用された(14)。2つのエフェクタープラスミド、GAL4 DBDのみを発現するpSG424、及びGAL4 DBDのC末端に融合されたヒトZHX3の全コード領域を発現するpGAL4-ZHX3(1-956)を調製した。第10図及び第11図に示すように、5×GAL4-pGL3Control及びさまざまな量のpGAL4-ZHX3(1-956)をHEK293細胞中に共トランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は用量依存的な様式で減少された。上記最高阻害は50 ngのpGAL4-ZHX1(1-956)で得られた。対照的に、GAL4-結合部位の5つのコピーを欠く上記pGL3-ControlをpSG424又はpGAL4-ZHX3(1-956)でトランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は変化しなかった(第10図)。これらの結果は、上記GAL4-ZHX3融合タンパク質はGAL4結合部位依存的な様式でルシフェラーゼ活性を減少させることを示し、ZHX3は転写リプレッサーとしてはたらくことを示す。

15 発明者らはその後ZHX3のZHX1とのヘテロ二量体化はその転写リプレッサー活性に必要であるかどうかの問題を調べた。発明者らは、ZHX1の272～423のアミノ酸配列が発現される、pCMV-ZHX3(272-432)を調製した。この領域はZHX1のZHX3との二量体化ドメインと一致するが、ZHX1のリプレッサードメインは含まない(Yamada, K., Kawata, H., Matsuura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374)。従って、このタンパク質の過剰発現はZHX1のドミナントネガティブ形として機能する。上記プラスミドを上記分析システムにおいて共トランスフェクトしたとき、上記ルシフェラーゼ活性は用量依存的な様式で増加された(第11図)。対照的に、pcDNA3.1HisC-2の共トランスフェクトはルシフェラーゼ活性に全く影響しなかった。これらの結果は、ZHX3のZHX1とのヘテロ二量体化はリプレッサー活性の必要条件であることを示す。

最後に、ZHX3の最小リプレッサードメインを決定するために、上記5×G

AL4-pGL3Controlをさまざまなプラスミド、pGAL4-ZHX3 (1-145)、pGAL4-ZHX3 (146-303)、pGAL4-ZHX3 (303-555) 又はpGAL4-ZHX3 (498-903) でトランスフェクトした (第12図)。残基303~555のアミノ酸配列を発現するpGAL4-ZHX3 (303-555) のみが、ルシフェラーゼ活性における減少を引き起こした。

より詳細な分析のために、発明者らはエフェクタープラスミド、pGAL4-ZHX3 (303-502)、pGAL4-ZHX3 (303-364) 又はpGAL4-ZHX3 (364-502) を調製した。pGAL4-ZHX3 (303-502) を上記レポータープラスミドでトランスフェクトしたときのみ、上記ルシフェラーゼ活性は減少された (第12図)。これらの結果は、ZHX3の残基303~502のアミノ酸配列はリプレッサー活性に重要であることを示す。

実施例 6

本実施例では、ZHX3タンパク質の細胞内局在を調べるために、GFP-ZHX3融合タンパク質発現系を使用して、ZHX3の細胞内局在の決定及び核移行シグナル (NLS) のマッピングを行った。このため、GFPに融合したZHX3のさまざまな切断された形態を調製した。これらのプラスミドをHEK293細胞中にトランスフェクトし、そしてGFP融合タンパク質の細胞内局在を観察した。GFPタンパク質のみをコードするpEGFP-C1E1は細胞全体において観察された (第13図)。対照的に、全長ZHX3がGFPのC末端に融合されたGFP-ZHX3 (1-956) は核内に局在した。ZHX3のNLSを決定するために、さまざまなプラスミドをトランスフェクトした。pGFP-ZHX3 (1-303)、pGFP-ZHX3 (303-555)、及びpGFP-ZHX3 (555-956) をトランスフェクトしたとき、pGFP-ZHX3 (1-303) 及びpGFP-ZHX3 (303-555) の両方が核内に局在した。対照的に、pGFP-ZHX3 (555-956) をトランスフェクトしたとき、上記タンパク質は核外に局在した。これらの結果は、ZHX3は2つのNLS及び核輸出シグナル (NES) を含むことを示す。最小のNLSsをマッ

ピングするために、さまざまなプラスミドを構築した。3のプラスミド、pGFP-P-ZHX3 (1-107)、pGFP-P-ZHX3 (364-555)、及びpGFP-P-ZHX3 (497-555)をトランスフェクトしたときのみ、ZHX3の核局在が観察された。これらの結果は、ZHX3はGFP融合タンパク質として核内に局在することができ、そしてZHX3の2つのNLSはそれぞれ1~107、及び497~555のアミノ酸配列に位置することを示す。

上記実施例にて、ZHX-1相互作用タンパク質の探索を行い、主にそれらのうち新規転写リプレッサーZHX3を分析し、そしてその機能ドメインをマッピングした。ZHX3の最小機能ドメインは第14図に要約される。ZHX1はもちろん、ZHX3は2つのZn fモチーフ及び5つのHDを含み、ホモ二量体を形成し、NF-YAのADと相互作用し、そして核内に局在する。さらに、ZHX3 mRNAは普遍的に発現される。この発見から、発明者らは、ZHX1及びZHX3の両方が同じファミリー、すなわち、ZHXファミリーの構成員であることを結論づけた。ZHX1及びZHX3の全アミノ酸配列の相同性は34.4%であったが、上記2つのZn fモチーフ及び5つのHDは高く保存されていた。ZHX1及びZHX3の間のZn f 1、Zn f 2、HD 1、HD 2、HD 3、HD 4、及びHD 5のアミノ酸配列における相同性は、それぞれ50.0、45.5、61.7、50.0、53.3、43.3、及び33.3%であった。上記HD 4は他のドメインよりも非常に低い相同性を示した。独特のグルタミン酸-リッチ酸性領域がZHX3の残基670~710のアミノ酸配列中に局在する(第1図及び第9図)。一般的に、上記Zn fモチーフ、HD、及び酸性領域は転写因子の機能特性に責任がある。例えば、60アミノ酸から成る、上記Zn fモチーフ及びHDの両方は同族のDNA配列に結合するのに必要とされ、上記グルタミン酸-リッチ領域は転写活性に関係し、そして塩基性領域は上記DBD又はNLSである(Gehring, W. J., Affolter, M., and Burglin, T. (1994) Annu. Rev. Biochem. 63, 487-526 等)。

ZHX3はZHX1とヘテロ二量体を形成するのみでなく、ホモ二量体をも形成する。ZHX3の242~488のアミノ酸配列はこれらの二量体化に必要及

び十分である(第3図~第7図)。ZHX1のZHX3とのホモ及びヘテロ二量体化の最小ドメインはZHX1の272~432のアミノ酸配列にマッピングされた(第3図~第5図)。これらの領域はHD1を含むが、HD1のみは二量体化できない(第3図~第9図)。HD1を含むより広範な領域が二量体化に必要とされる。さらに、ZHX3及びZHX1の両方がNF-YAのADと相互作用する；前者は上記NF-YAのセリン/スレオニン-リッチADと、そして後者はグルタミン-リッチADとそれぞれ相互作用する(第8図、第9図)。ZHX3のNF-YAのADとの相互作用ドメインはZHX3の二量体化ドメインと同じ領域にマッピングされた(第8図、第9図)。対照的に、ヒトZHX1のHD1~HD2領域を含む272~564のアミノ酸配列はその相互作用に必要とされる(Yamada, K., Osawa, H., and Granner, D. K. (1999) FEBS Lett. 460, 41-45)。ZHX1のZHX3とのヘテロ二量体複合体がNF-YAの異なるADと相互作用するかどうかの問題は決定されないままである。

ZHX3は転写リプレッサーである(第10図~第12図)。ZHX3の最小リプレッサードメインは二量体化及び相互作用ドメインの両方と重なる領域にマッピングされる。興味深いことに、ZHX1のヘテロ二量体化ドメインの過剰発現は、リプレッサー活性には責任はないが、ZHX3のリプレッサー活性における減少を引き起こした(第11図)。このことは、ZHX3は本質的にリプレッサー活性をもたず、そして上記観察された活性は二量体化のパートナーである、リプレッサードメインが酸性領域のC末端に局在する(Yamada, K., Kawata, H., Matsuura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) Biochem. Biophys. Res. Comm. 279, 368-374) ZHX1のリプレッサー活性に因るものであることを示唆する。しかしながら、ZHX3の二量体化ドメインは真実にリプレッサー活性を有することを証明することはできない。ZHX3がDNA結合タンパク質であるかどうかは明らかでない。その結果として、HD1領域を含むZHX3の領域は多面発現性のドメイン；ホモ及びZHX1とのヘテロ二量体化ドメイン、NF-YAのADとの相互作用ドメイン、及びリプレッサードメインであるように見える。

転写制御領域は転写リプレッサーとして機能するために共因子と相互作用する (Hu, X., and Lazar, M. A. (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11, 6-10 等)。これらの共因子はmS i n 3 A/B、ヒストンデアセチレース、及び受容体転写の核共リプレッサー(N-C o R)/サイレンシング仲介物質を含む。

- 5 ZHX 1相互作用タンパク質として、発明者らは2つの共リプレッサー、BS 6 9及びATF-I P (表1)をクローニングした (Hateboer, G., Gennissen, A., Ramos, Y. F. M., Kerkhoven, R. M., Sonntag-Buck, V., Stunnenberg, H. G., and Bernards. R. (1995) EMBO J. 14, 3159-3169 等)。BS 6 9ははじめに289 Rアデノウイルスタイプ5 E1 Aタンパク質の
- 10 ADと直接相互作用するタンパク質として同定された。BS 6 9は、少なくとも部分的には、BS 6 9のMYNDドメインの共リプレッサーN-C o Rとの相互作用を通して、抑制を仲介することも報告されている (Masselink, H., and Bernards, R. (2000) Oncogene 19, 1538-1546)。対照的に、ATF-I Pは、RNAポリメラーゼIIホロエンザイムを含む、基本の転写機構 (TF I
- 15 IE及びTF I IH)のいくつかの成分と相互作用する (DeGraeve, F., Bahr, A., Chatton, B., and Kedinger, C. (2000) Oncogene 10, 1807-1819)。ZHX 1及びZHX 3が転写リプレッサーとしてはたらくとき、これらの共リプレッサーと相互作用することができ、それゆえ遺伝子転写を抑制する。

- さらに、ZHX 1及びZHX 3の両方はNF-YA相互作用タンパク質である。
- 20 NF-Yは共アクチベーター、p 3 0 0及びp 3 0 0/環状AMP応答エレメント-結合タンパク質-結合タンパク質-関連因子 (P/CAF)と関連することが報告されている (Mantovani, R. (1999) Gene 239, 15-27)。特に、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を伴うP/CAFはNF-YAと相互作用し、転写的に活性なNF-Y複合体を形成する (Mantovani, R. (1999) Gene
- 25 239, 15-27)。それゆえ、ZHX 1、ZHX 3、及びNF-YA間の相互作用の組み合わせはNF-Yの転写活性に影響するようである。例えば、ZHX 1又はZHX 3のどちらか、又は両方は、P/CAFの上記NF-Yとの関連を高め又は妨害することができ、それゆえNF-Y活性を制御する。さらに、共リプレッサーを伴う転写リプレッサー、ZHXファミリーの構成員は、上記NF-YAと

直接関連することができ、それゆえ、NF-Y活性を阻害する。どちらの場合においても、ZHXタンパク質がいくつかのNF-Y制御可能な遺伝子の制御に参加する可能性がある。

ZHX3 mRNAは普遍的に発現されるが、骨格筋、腎臓、及び精巣においてより高く発現されることがわかった（第2図）。ZHX3 mRNAの大きさはノザンプロット分析により決定されるように複数であった。クローニングされた挿入物は9,302bpを含み、そして上記大きさはZHX3の最も大きな転写物と同じである。ヒトZHX3遺伝子の探索がヒトゲノムプロジェクトにより編集されたデータベースを用いて行われたとき、それは染色体20qに局在することがわかった。このことは、ZHX3遺伝子はハプロイドヒトゲノム当たり単一のコピーとして存在することを示す。ZHX3 cDNAのヌクレオチド配列は、複数のポリアデニル化シグナルが3'-非コード領域内に存在することを明らかにした。それゆえ、より小さな大きさのmRNAは、他のZHX3関連のmRNAの存在よりもむしろ単一の遺伝子からの異なるポリアデニル化シグナルの使用により産生されうるようである。

ZHX3の全コード領域が上記GFPのC末端に融合されたとき、それは核内に局在した（第13図）。ZHX3の2つのNLS、それぞれ1~107、及び497~555のアミノ酸配列があった。その一方で、上記GFPに融合されたZHX3の498~956のアミノ酸配列は細胞全体ではなく、核外に排他的に局在する。GFPのみ又はNLSを欠くGFP-ZHX1融合タンパク質は細胞全体に局在する（第13図）。このことは、ZHX3の領域はNESを含むことを示す。それゆえ、ZHX3は1つの分子内に2つのNLS及び1つのNESを含む、より複雑なタンパク質である。ZHX1を含む多くの他のタンパク質においては、上記NLSは塩基アミノ酸残基のクラスターにマッピングされたことが報告されている（Yamada, K., Kawata, H., Matsuura, K., Shou, Z., Hirano, S., Mizutani, T., Yazawa, T., Yoshino, M., Sekiguchi, T., Kajitani, T., and Miyamoto, K. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279, 368-374 等）。この領域はインポルチン α の如き、核輸入タンパク質と関連し、そしてそれから細胞質から核へ移行される（Kaffman, A., and O'Shea,

E. K. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 291-339)。しかしながら、ZHX 3 の 2 つの NLS は塩基性領域には局在せず、そして以前に報告された NES とは相同性を示さないので、ZHX 3 は核へ移行されるための他の分子と関連しうる。

請求の範囲

1. 配列番号1で表されるアミノ酸配列若しくは該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は配列
- 5 番号1で表されるアミノ酸配列の機能部分若しくは該機能部分において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むアミノ酸配列から成り、転写抑制活性を有するタンパク質又はペプチド。
2. 前記機能部分が、配列番号1で表されるアミノ酸配列の303～502番目のアミノ酸配列である請求項1に記載のタンパク質又はペプチド。
- 10 3. 請求項1又は2に記載のタンパク質又はペプチドを有効成分とする、転写抑制を目的とする薬剤。
4. 肝癌細胞でのみ発現する遺伝子の転写を抑制する請求項1又は2に記載のタンパク質又はペプチド。
5. 前記遺伝子がI I型ヘキソース又はピルビン酸キナーゼMである請求項4
- 15 に記載のタンパク質又はペプチド。
6. 請求項4又は5に記載のタンパク質又はペプチドを有効成分とする肝癌の治療薬。
7. 請求項1又は2に記載のペプチド又はタンパク質を特異的に認識することができる抗体。
- 20 8. 請求項7に記載の抗体を有効成分とする、転写抑制活性を有する薬剤のスクリーニング剤。

第 1 図

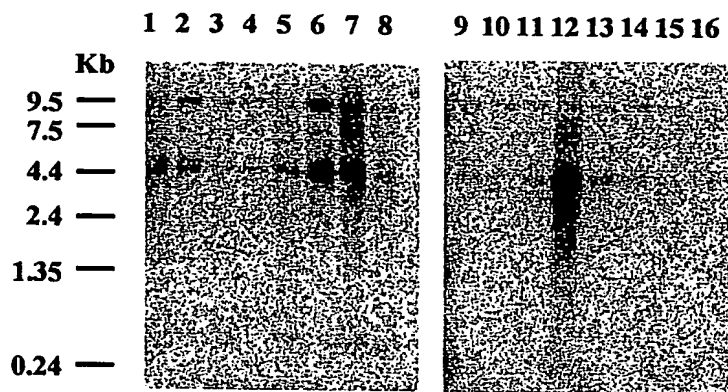
```

ZHX3 1:MASKRKSTTPCMIPVKTVVLQDASMEAQPAETLPEGPQODLPFEASAASSEAQNPSSTD 60
ZHX1 1:MASRRKSTTPCMV-L-ASE-QDPDL-LISD-LDEGP-PVLTVENTRAESISSDEEVHE 54
      *** ***** ** * * * * *
      ++++++
ZHX3 61:GSTLANGHRSTLDGYLYSCKYCDFRSHDMTOFVGHMNSEHTDFNKDPTFVCSGCSFLAKT 120
ZHX1 55:SVSDNQONKKVEG-GYECKYCTFQTPDLNMTTFHVDSEHPNVVLNSSYVCVECNFLTKR 113
      * * * * * * * * * * * * * * *
      ++++++
ZHX3 121:PEGLSLHNATCHSGEASFVWNVAKPDNHVVVEQSIPESTSTPDLAGEPSAEGADGOAEII 180
ZHX1 114:YDALSEHNLYHPGEENFKLTMVKRNNQTFEQTINDLTFDGSFVKEENAEQAES-TEVS 172
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 181:ITKTPIMKIMKGKAEAKKIHTLKENVPSQPVGEALPKLSTGEMEVRREGDHSFINGAVPVS 240
ZHX1 173:SSGISISKTPIMKMMKNKVENKRIAVHNSV-EDVPE-EK-ENEIKPDREEIVENPSSA 229
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 241:QASASSAKNPHAANGPLIGTVPLPAGIAOFLSLQOQPPVHAQHVVHOPLPTAKALPKVM 300
ZHX1 230:SESNTSTSIVNRIHPSTASTV-VTPAAVLPGA-QVITAVSAQONS-L-----IPKVL 280
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 301:IPLSSIPTYNAAMDSNSFLKNSFHKFPYPTKAELCYLTVVTKYPEEOLKIWFATAORLKOG 360
ZHX1 281:IPVNSIPTYNAALDNNPLLNTYNKEPYPTMSEITVLSAOAKYTEEOIKIWFSAORLKHG 340
      ** ***** * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 361:ISWSPEEIEDARKKMFNTVIOQSVPOPTITVLNTPLVASAGNVQHLIOAALPGHVVGQPEG 420
ZHX1 341:VSWTPEEVEEARRKQFNGTVHTVPO-TITVIPTHTISTGSNGLESILQTC---QIVGQP-- 394
      ** * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 421:TGGGLLVTOPLMANGLOATSSPLPLTVTSVPKOPGVAPINTVCSNTTSAVKVNVAAQSLL 480
ZHX1 395:---GLVLTQVAGTNTLPVT-APIALTAVAGVPSQNNIQKSQVPAQAQPTAETKPATAAVPTS 450
      ** ** * * * * * * * * * * *
ZHX3 481:TACPSITSOAFLDASIYKNKKSHEOLSALKGSFCRNOFPGOSEVEHLTKVTGLSTREVRK 540
ZHX1 451:QSVKHETALVNPDSFGIRAKTKEOLAEKVSYLKNOPPHDSEIIRLMKITGLTRGEIKK 510
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 541:WFSDRYHCRNLKGSRAMIPGDHSSIIIDSVPEVSFSPSSKVPEVTCIPTTATLATHPSA 600
ZHX1 511:WFSDRYHCRNLKGSRAMIPGDHSSIIIDSVPEVSFSPSSKVPEVTCIPTTATLATHPSA 557
      ***** ** * * * * * * * * * * *
ZHX3 601:KQSWHQTDPDFTPTKYKERAPEOLRALESSFAONPLPLDEELDRLRSETKMTREIDSWF 660
ZHX1 558:K-QSWNPFPDFTPOKFEKTAEOQLVLOASFLNSSLTDEELNRLRAOTKLTRREIDAWF 616
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 661:SERRKKVNAEETKKAENASQEEEEAAEDEGGEEDLASELRVSGENGSLMPSSHILAER 720
ZHX1 617:TE-KRKSALKEEKMEID--ESNAGSSKEEAGETSPADE-SGAPKSGSTGKICKKT-PE- 670
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 721:KVSPKINLKNLRVTEANGRNEIPGLGACDPEDDESINKLAELPGKVSCKTAQORHLR 780
ZHX1 671:OLHMLKSAF--VR-TOWPSPEEYDKLAK-ESGLARTD-IVSWF-GDTRYAWK-NG-NLKW 722
      * * * * * * * * * * *
ZHX3 781:OLFVOTOWPSNODYDSIMAOTGLPRPEVVRWFGDSRYALKNGOLKWEYEDYKRGNFPPGLL 840
ZHX1 723:YVYQSANSSSMNGLSSLRKRGRGRPKGRGR-CRPR-CRPRGS-KRINNWDRG---PSLI 776
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 841:VIAPGNRELLDYIMTHKMLYEEDLONLCKDTOMSSQOVKOWFAEKMGEETRAVADTGSE 900
ZHX1 777:KFKTGT-AILKDYVLKHKFLNEODLDELVNKSHMGYEOVREWFARORRSELGI-EL-FE 833
      * * * * * * * * * * * * * * *
ZHX3 901:DOGPGTGELTAVHKMGMDTYSEVSENSESWEPRVPEASSEPFDTSSPOAGRQLETD 956
ZHX1 834:ENE-EDEV--ID-DQED-EEETDDSDTWEP--PRHVKRKLSKSD 873
      * * * * *

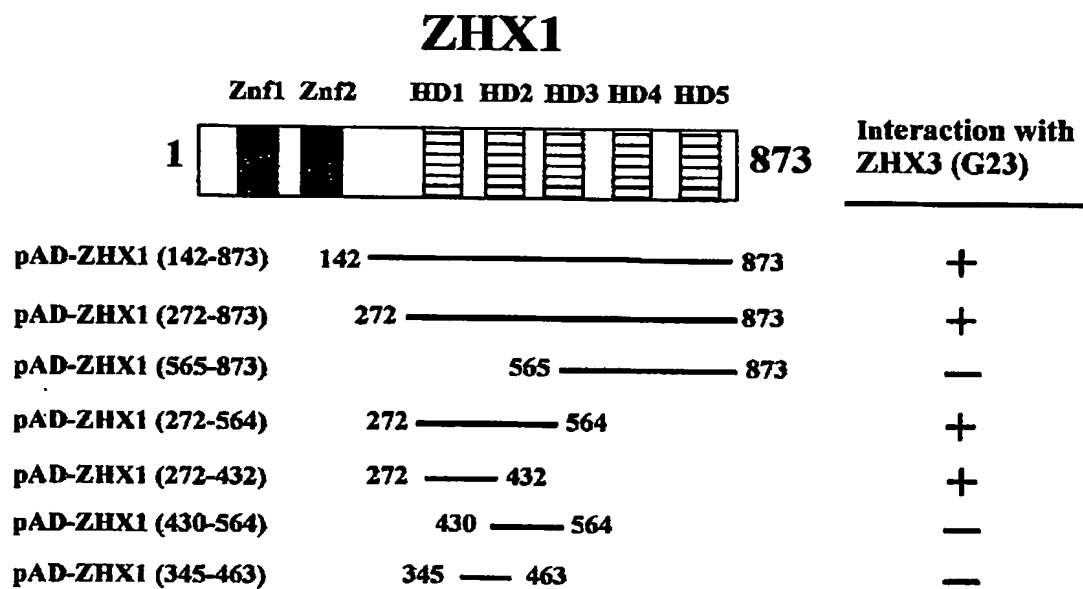
```

2/8

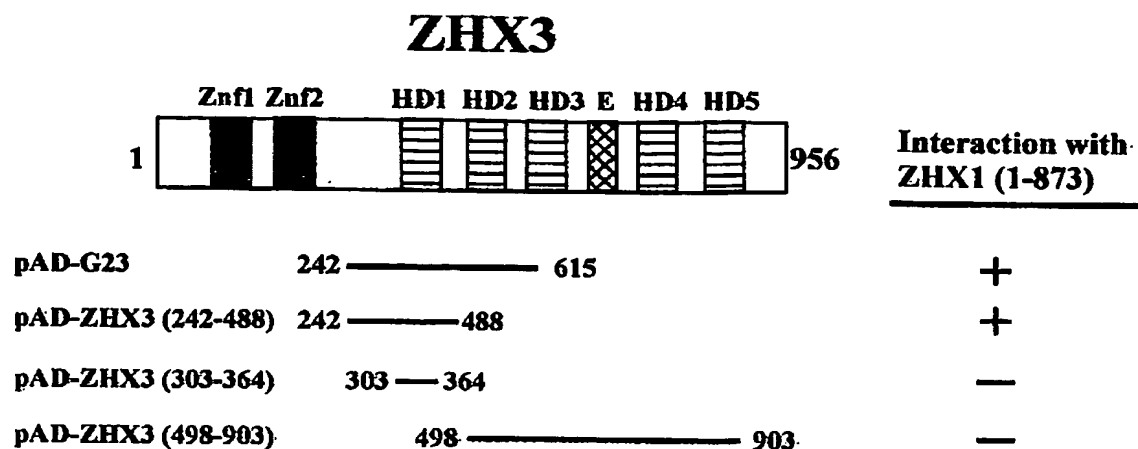
第 2 図



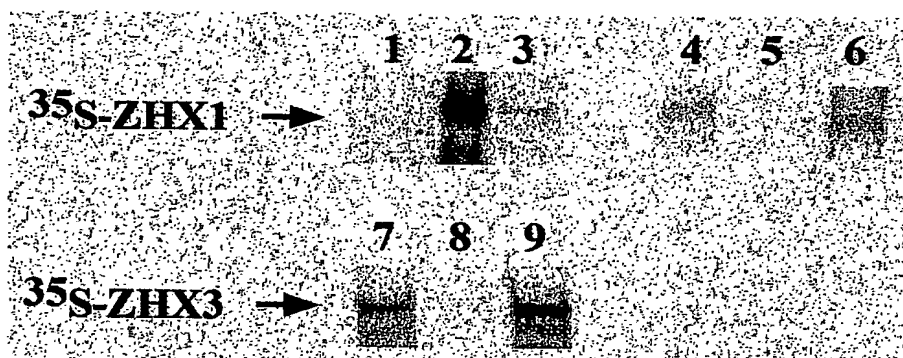
第 3 図



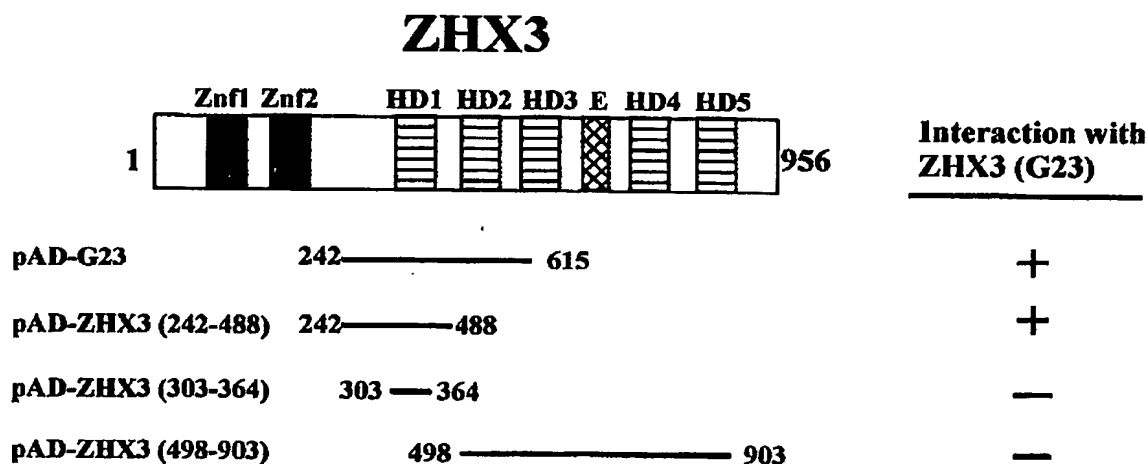
第 4 図



第 5 図

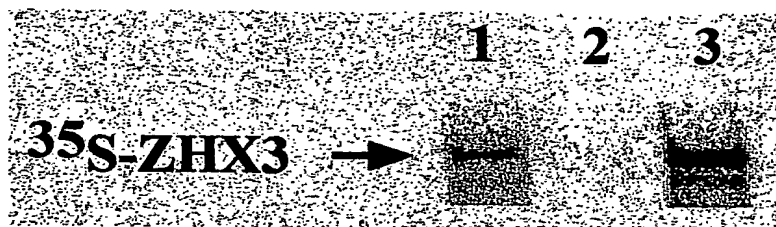


第 6 図

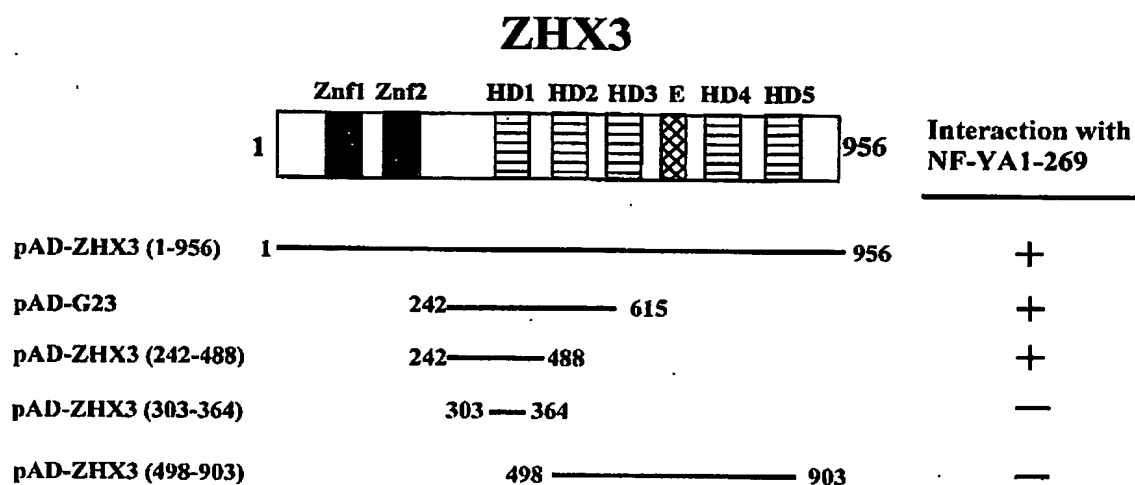


4/8

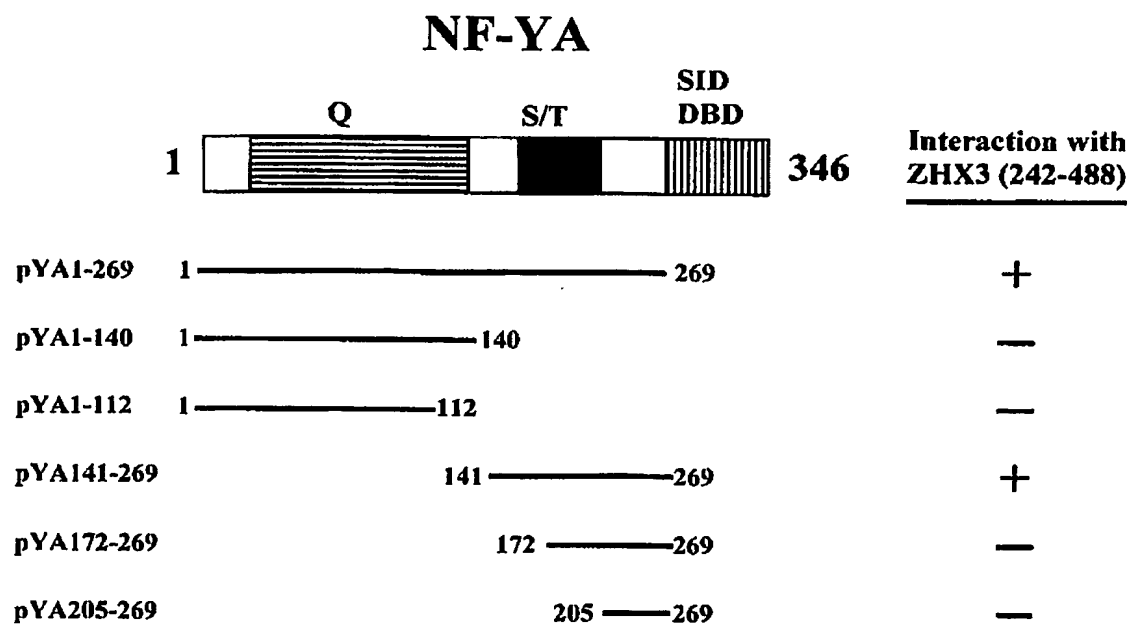
第 7 図



第 8 図

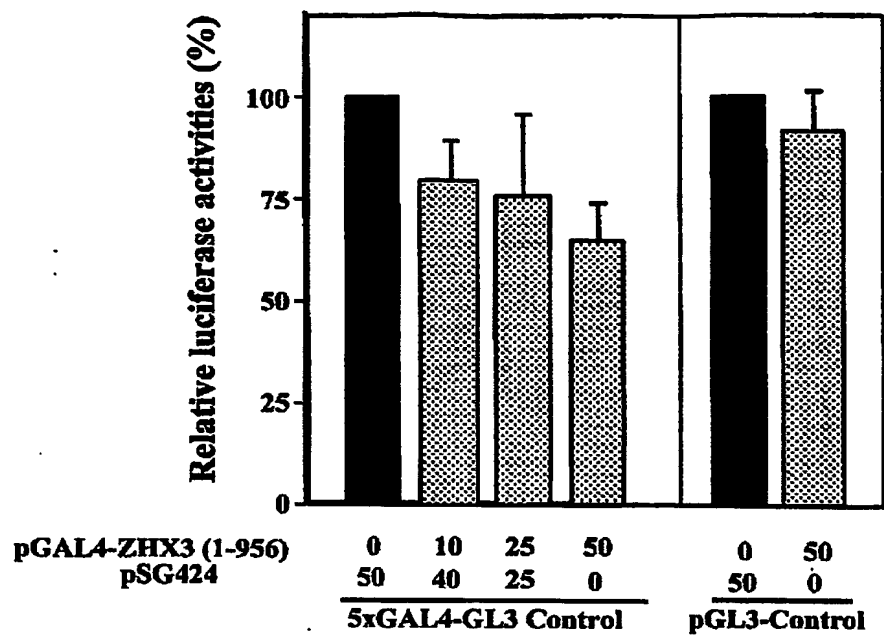


第 9 図

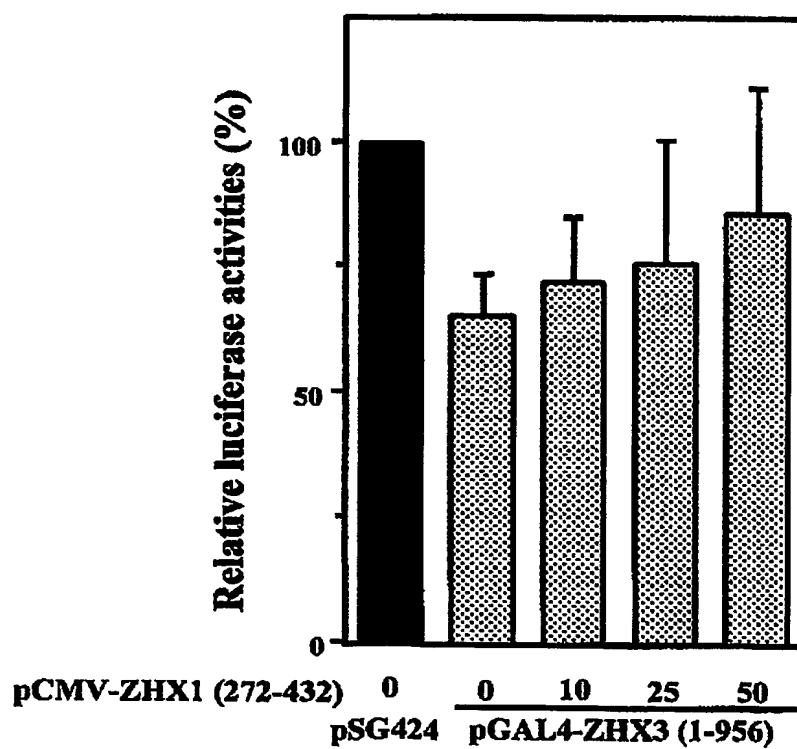


5/8

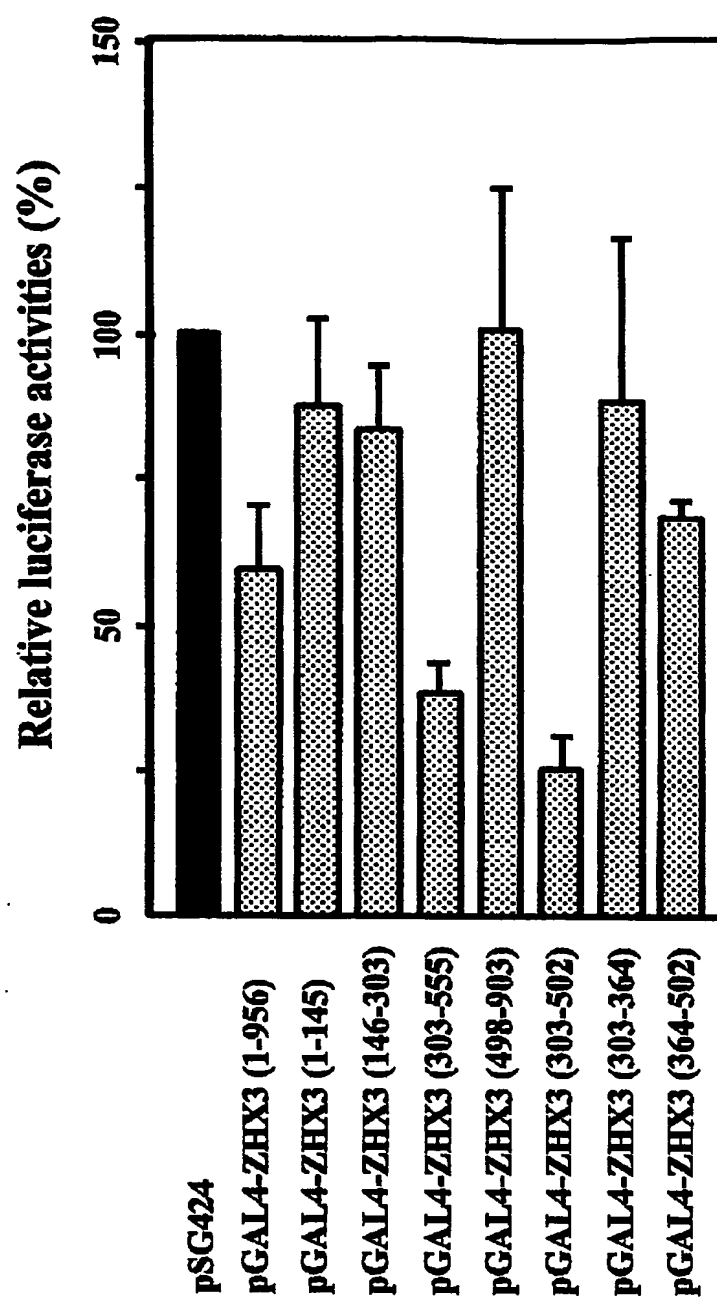
第 1 0 図



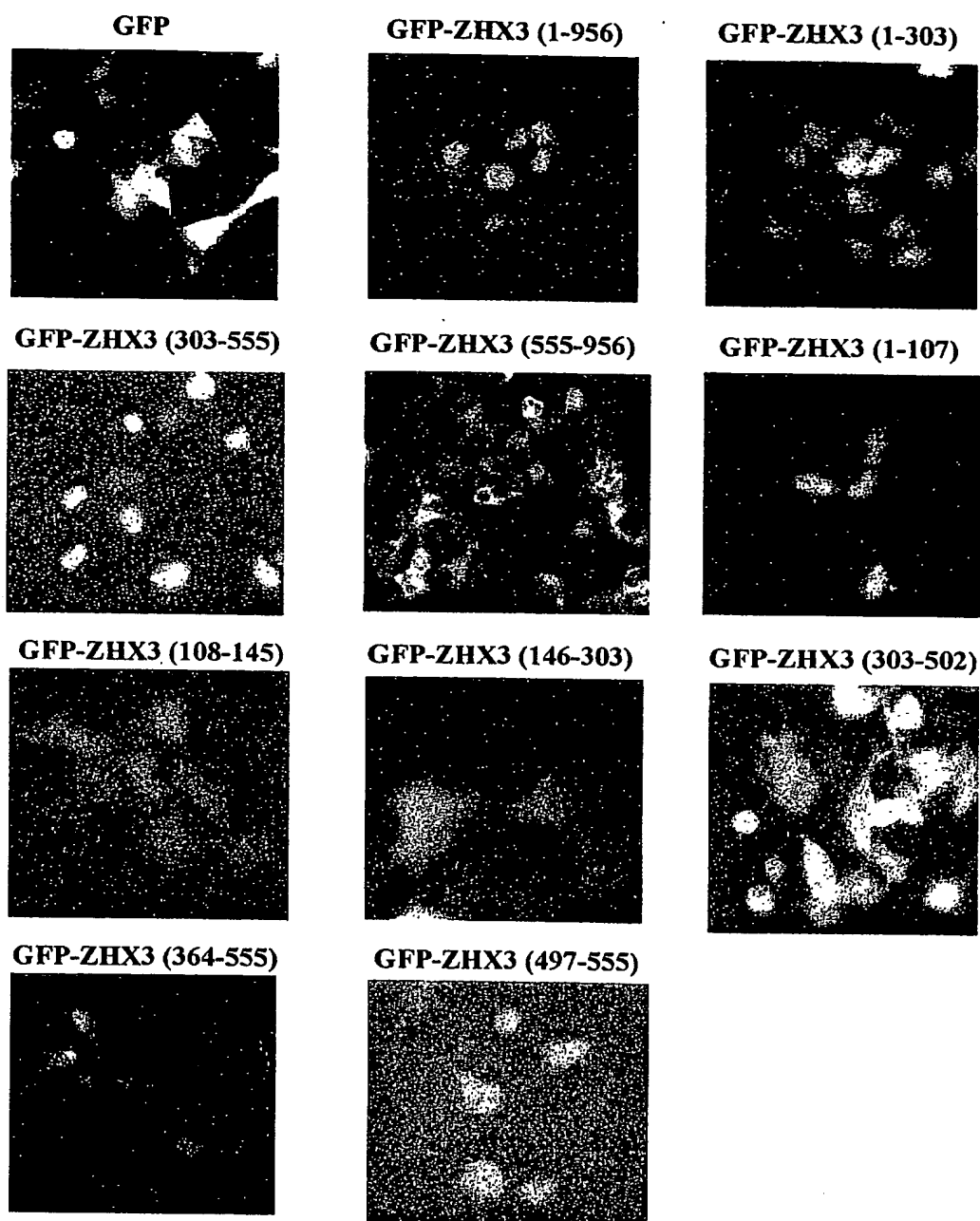
第 1 1 図



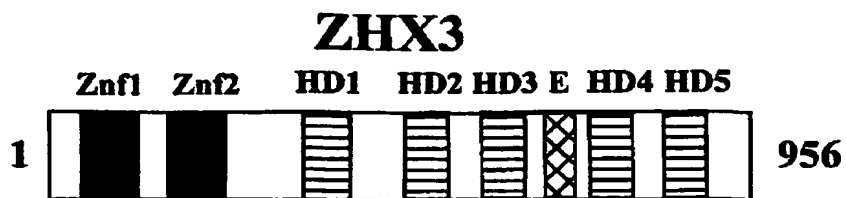
第 1 2 図



第 1 3 図



第 1 4 図



DD 242 ——— 488

ID 242 ——— 488

RD 303 ——— 502

NLS1 1 ——— 107

NLS2 497 ——— 555

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 転写制御因子 ZHX 3

<130> FS03-323PCT

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 956

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Lys Arg Lys Ser Thr Thr Pro Cys Met Ile Pro Val Lys

1 5 10 15

Thr Val Val Leu Gln Asp Ala Ser Met Glu Ala Gln Pro Ala Glu Thr

20 25 30

Leu Pro Glu Gly Pro Gln Gln Asp Leu Pro Pro Glu Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Ser Ser Glu Ala Ala Gln Asn Pro Ser Ser Thr Asp Gly Ser Thr Leu

50 55 60

Ala Asn Gly His Arg Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Leu Tyr Ser Cys Lys

65 70 75 80

Tyr Cys Asp Phe Arg Ser His Asp Met Thr Gln Phe Val Gly His Met

85 90 95

Asn Ser Glu His Thr Asp Phe Asn Lys Asp Pro Thr Phe Val Cys Ser

100 105 110

Gly Cys Ser Phe Leu Ala Lys Thr Pro Glu Gly Leu Ser Leu His Asn

115 120 125

Ala Thr Cys His Ser Gly Glu Ala Ser Phe Val Trp Asn Val Ala Lys

130 135 140

2/14

Pro Asp Asn His Val Val Val Glu Gln Ser Ile Pro Glu Ser Thr Ser

145 150 155 160

Thr Pro Asp Leu Ala Gly Glu Pro Ser Ala Glu Gly Ala Asp Gly Gln

165 170 175

Ala Glu Ile Ile Ile Thr Lys Thr Pro Ile Met Lys Ile Met Lys Gly

180 185 190

Lys Ala Glu Ala Lys Lys Ile His Thr Leu Lys Glu Asn Val Pro Ser

195 200 205

Gln Pro Val Gly Glu Ala Leu Pro Lys Leu Ser Thr Gly Glu Met Glu

210 215 220

Val Arg Glu Gly Asp His Ser Phe Ile Asn Gly Ala Val Pro Val Ser

225 230 235 240

Gln Ala Ser Ala Ser Ser Ala Lys Asn Pro His Ala Ala Asn Gly Pro

245 250 255

Leu Ile Gly Thr Val Pro Val Leu Pro Ala Gly Ile Ala Gln Phe Leu

260 265 270

Ser Leu Gln Gln Gln Pro Pro Val His Ala Gln His His Val His Gln

275 280 285

Pro Leu Pro Thr Ala Lys Ala Leu Pro Lys Val Met Ile Pro Leu Ser

290 295 300

Ser Ile Pro Thr Tyr Asn Ala Ala Met Asp Ser Asn Ser Phe Leu Lys

305 310 315 320

Asn Ser Phe His Lys Phe Pro Tyr Pro Thr Lys Ala Glu Leu Cys Tyr

325 330 335

Leu Thr Val Val Thr Lys Tyr Pro Glu Glu Gln Leu Lys Ile Trp Phe

340 345 350

Thr Ala Gln Arg Leu Lys Gln Gly Ile Ser Trp Ser Pro Glu Glu Ile

355 360 365

Glu Asp Ala Arg Lys Lys Met Phe Asn Thr Val Ile Gln Ser Val Pro

370 375 380
Gln Pro Thr Ile Thr Val Leu Asn Thr Pro Leu Val Ala Ser Ala Gly
385 390 395 400
Asn Val Gln His Leu Ile Gln Ala Ala Leu Pro Gly His Val Val Gly
405 410 415
Gln Pro Glu Gly Thr Gly Gly Gly Leu Leu Val Thr Gln Pro Leu Met
420 425 430
Ala Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Val Thr
435 440 445
Ser Val Pro Lys Gln Pro Gly Val Ala Pro Ile Asn Thr Val Cys Ser
450 455 460
Asn Thr Thr Ser Ala Val Lys Val Val Asn Ala Ala Gln Ser Leu Leu
465 470 475 480
Thr Ala Cys Pro Ser Ile Thr Ser Gln Ala Phe Leu Asp Ala Ser Ile
485 490 495
Tyr Lys Asn Lys Lys Ser His Glu Gln Leu Ser Ala Leu Lys Gly Ser
500 505 510
Phe Cys Arg Asn Gln Phe Pro Gly Gln Ser Glu Val Glu His Leu Thr
515 520 525
Lys Val Thr Gly Leu Ser Thr Arg Glu Val Arg Lys Trp Phe Ser Asp
530 535 540
Arg Arg Tyr His Cys Arg Asn Leu Lys Gly Ser Arg Ala Met Ile Pro
545 550 555 560
Gly Asp His Ser Ser Ile Ile Ile Asp Ser Val Pro Glu Val Ser Phe
565 570 575
Ser Pro Ser Ser Lys Val Pro Glu Val Thr Cys Ile Pro Thr Thr Ala
580 585 590
Thr Leu Ala Thr His Pro Ser Ala Lys Arg Gln Ser Trp His Gln Thr
595 600 605

Pro Asp Phe Thr Pro Thr Lys Tyr Lys Glu Arg Ala Pro Glu Gln Leu
610 615 620
Arg Ala Leu Glu Ser Ser Phe Ala Gln Asn Pro Leu Pro Leu Asp Glu
625 630 635 640
Glu Leu Asp Arg Leu Arg Ser Glu Thr Lys Met Thr Arg Arg Glu Ile
645 650 655
Asp Ser Trp Phe Ser Glu Arg Arg Lys Lys Val Asn Ala Glu Glu Thr
660 665 670
Lys Lys Ala Glu Glu Asn Ala Ser Gln Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu
675 680 685
Asp Glu Gly Gly Glu Glu Asp Leu Ala Ser Glu Leu Arg Val Ser Gly
690 695 700
Glu Asn Gly Ser Leu Glu Met Pro Ser Ser His Ile Leu Ala Glu Arg
705 710 715 720
Lys Val Ser Pro Ile Lys Ile Asn Leu Lys Asn Leu Arg Val Thr Glu
725 730 735
Ala Asn Gly Arg Asn Glu Ile Pro Gly Leu Gly Ala Cys Asp Pro Glu
740 745 750
Asp Asp Glu Ser Asn Lys Leu Ala Glu Gln Leu Pro Gly Lys Val Ser
755 760 765
Cys Lys Lys Thr Ala Gln Gln Arg His Leu Leu Arg Gln Leu Phe Val
770 775 780
Gln Thr Gln Trp Pro Ser Asn Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Met Ala Gln
785 790 795 800
Thr Gly Leu Pro Arg Pro Glu Val Val Arg Trp Phe Gly Asp Ser Arg
805 810 815
Tyr Ala Leu Lys Asn Gly Gln Leu Lys Trp Tyr Glu Asp Tyr Lys Arg
820 825 830
Gly Asn Phe Pro Pro Gly Leu Leu Val Ile Ala Pro Gly Asn Arg Glu

835 840 845
Leu Leu Gln Asp Tyr Tyr Met Thr His Lys Met Leu Tyr Glu Glu Asp
850 855 860
Leu Gln Asn Leu Cys Asp Lys Thr Gln Met Ser Ser Gln Gln Val Lys
865 870 875 880
Gln Trp Phe Ala Glu Lys Met Gly Glu Glu Thr Arg Ala Val Ala Asp
885 890 895
Thr Gly Ser Glu Asp Gln Gly Pro Gly Thr Gly Glu Leu Thr Ala Val
900 905 910
His Lys Gly Met Gly Asp Thr Tyr Ser Glu Val Ser Glu Asn Ser Glu
915 920 925
Ser Trp Glu Pro Arg Val Pro Glu Ala Ser Ser Glu Pro Phe Asp Thr
930 935 940
Ser Ser Pro Gln Ala Gly Arg Gln Leu Glu Thr Asp
945 950 955
<210> 2
<211> 522
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 2
Cys Ser Phe Leu Ala Lys Thr Pro Glu Gly Leu Ser Leu His Asn Ala
1 5 10 15
Lys Cys His Ser Gly Glu Ala Ser Phe Leu Trp Asn Val Thr Lys Pro
20 25 30
Asp Asn His Val Val Val Glu Gln Ser Val Pro Glu Asn Ala Ser Ser
35 40 45
Ser Val Leu Ala Gly Glu Ser Thr Glu Gly Thr Glu Ile Ile Ile Thr
50 55 60
Lys Thr Pro Ile Met Lys Ile Met Lys Gly Lys Ala Glu Ala Lys Lys

6/14

65 70 75 80
Ile His Met Leu Lys Glu Asn Ala Pro Thr Gln Pro Gly Gly Glu Ala
 85 90 95
Leu Pro Lys Pro Leu Ala Gly Glu Thr Glu Gly Lys Glu Gly Asp His
 100 105 110
Thr Phe Ile Asn Gly Ala Thr Pro Val Ser Gln Ala Ser Ala Asn Ser
 115 120 125
Thr Lys Pro Pro His Thr Ala Asn Gly Pro Leu Ile Gly Thr Val Pro
 130 135 140
Val Leu Pro Ala Gly Ile Ala Gln Phe Leu Ser Leu Gln Gln Pro Thr
145 150 155 160
Val His Pro Gln His His Pro His Gln Pro Leu Pro Thr Ser Lys Ala
 165 170 175
Leu Pro Lys Val Met Ile Pro Leu Ser Ser Ile Pro Thr Tyr Asn Ala
 180 185 190
Ala Met Asp Ser Asn Ser Phe Leu Lys Asn Ser Phe His Lys Phe Pro
 195 200 205
Tyr Pro Thr Lys Ala Glu Leu Cys Tyr Leu Thr Val Val Thr Lys Tyr
 210 215 220
Pro Glu Glu Gln Leu Lys Ile Trp Phe Thr Ala Gln Arg Leu Lys Gln
225 230 235 240
Gly Ile Ser Trp Ser Pro Glu Glu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Lys Met
 245 250 255
Phe Asn Thr Val Ile Gln Ser Val Pro Gln Pro Thr Ile Thr Val Leu
 260 265 270
Asn Thr Pro Leu Val Ala Ser Ala Gly Asn Val Gln His Leu Ile Gln
 275 280 285
Ala Ala Leu Pro Gly His Ala Val Gly Gln Pro Glu Gly Thr Ala Gly
 290 295 300

7/14

Gly Leu Leu Val Thr Gln Pro Leu Met Ala Asn Gly Leu Gln Ala Ser

305 310 315 320

Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ser Val Pro Lys Pro Thr Ala

325 330 335

Ala Pro Ile Asn Thr Val Cys Ser Asn Thr Thr Ser Ala Val Lys Val

340 345 350

Val Asn Ala Ala Gln Ser Leu Leu Thr Ala Cys Pro Ser Ile Thr Ser

355 360 365

Gln Ala Phe Leu Asp Ala Asn Ile Tyr Lys Asn Lys Lys Ser His Glu

370 375 380

Gln Leu Ser Ala Leu Lys Gly Ser Phe Cys Arg Asn Gln Phe Pro Gly

385 390 395 400

Gln Ser Glu Val Glu His Leu Thr Lys Val Thr Gly Leu Ser Thr Arg

405 410 415

Glu Val Arg Lys Trp Phe Ser Asp Arg Arg Tyr His Cys Arg Asn Leu

420 425 430

Lys Gly Thr Arg Ala Met Val Pro Gly Glu His Gly Ser Val Leu Ile

435 440 445

Asp Ser Val Pro Glu Val Pro Phe Pro Leu Ser Ser Lys Val Pro Glu

450 455 460

Val Pro Cys Val Pro Thr Ala Thr Ser Leu Val Ser His Pro Ala Thr

465 470 475 480

Lys Arg Gln Ser Trp His Gln Thr Pro Asp Phe Thr Pro Thr Lys Tyr

485 490 495

Lys Glu Arg Ala Pro Glu Gln Leu Arg Val Leu Glu Ser Ser Phe Ala

500 505 510

Gln Asn Pro Leu Pro Pro Glu Glu Glu Leu

515 520

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

agcttcccgga attctgcag

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 4

tcgactgcag aattcggga

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 5

gtggcagaca caggcagtg

19

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 6

ggccggatcc cagactggcc agtcc

25

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 7

cctgagcagc attccaacg

19

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 8

ottcttggtc tcctcagcat tcac

24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 9

gtgattgtca ccatggccag

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 10

gaaggagttc ttcaggaagc

20

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 11

ccgggaattc ctgagcagca ttccaacgta

30

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 12

ccggggatcc agcccttcaa gttccggc

28

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 13

ccggggatcc agatttctta tttttgtaga tgc

33

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 14

ccgggaattc tcccctgagg agattgagg

29

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 15

ccgggaattc tacaaaaata agaaatctca tgaac

35

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 16

ccggggatcc ggaccagctg atccccctg

28

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 17

gtgggctgag gcacagactg

20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 18

ccaatcatga agataatgaa aggc

24

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 19

aattcccggg

10

<210> 20

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 20

gatcccggg

9

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 21

tatggaattc gc

12

<210> 22

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 22

catggcgaat tcca

14

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 23

ccgggaattc ggaccagctg atcccctg

28

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 24

ccgggaattc atggccagca agaggaaatc

30

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 25

ccggggatcc cagggggatc atcactttg

29

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 26

ccggggatcc tggcttgcc acgttccac

29

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 27

ccgggggatcc tggcttggcc acgttcac

29

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 28

ccgggggatcc tgggtcttta ttaaagtcg tg

32

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 29

ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg

30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 30

ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg

30

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 31

ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg

30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 32

ccgggaattc acctttgtat gcagtgggtg

30

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 33

aattccacca cactggatcc ctggtac

27

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 34

ggcatcttgc aacaccacag tcttc

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 35

catgcatggt gtggtggatt tcctc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09164

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, A61K38/45, A61K45/00,
A61P1/16, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, A61K38/45, A61K45/00,
A61P1/16, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 01/57190 A1 (HYSEQ, Inc.), 09 August, 2001 (09.08.01), Full text & US 2002/0128187 A1	<u>1-2, 4-5, 7</u> 3, 6, 8
A	Yamada K. et al., Identification of proteins that interact with NF-YA, FEBS Lett., 1999, Vol.460, No.1, pages 41-5	1-8
A	Yamada K. et al., Human ZHX1: cloning, chromosomal location, and interaction with transcription factor NF-Y, Biochem.Biophys.Res.Comm., 1999, Vol.261, No.3, pages 614-21	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 September, 2003 (03.09.03)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, A61K38/45, A61K45/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C07K14/47, C07K16/18, C12N15/12, A61K38/45, A61K45/00, A61P1/16, A61P35/00, G01N33/53, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 01/57190 A1 (HYSEQ, Inc.) 2001.08.09, 全文 & US 2002/0128187 A1	1-2, 4-5, 7 3, 6, 8
A	Yamada K. et al., Identification of proteins that interact with NF-YA, FEBS Lett., 1999, Vol.460, No.1, pages 41-5	1-8
A	Yamada K. et al., Human ZHX1: cloning, chromosomal location, and interaction with transcription factor NF-Y, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, Vol.261, No.3, pages 614-21	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.09.03

国際調査報告の発送日

16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448